Université de Paris — Faculté de Pharmacie

Année 1970 Série U - N°

THÈSES

présentées

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS
(Diplôme d'Université - Mention Pharmacie)

par

Isaac BLANCO FERNANDEZ

DOSAGE, REPARTITION ET VARIATIONS ONTOGENETIQUES DE L'HISTAMINE CEREBRALE

Soutenue le 26 JUIN 1970

JURY : MM. les Professeurs P.MALANGEAU, Président
J.R. BOISSIER
M.GUERNET Examinateurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523705_0082

Université de Paris — Faculté de Pharmacie

Année 1970 Série U - N°

THÈSES

présentées

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS
(Diplôme d'Université - Mention Pharmacie)

par

Isaac BLANCO FERNANDEZ

DOSAGE, REPARTITION ET VARIATIONS ONTOGENETIQUES DE L'HISTAMINE CEREBRALE

Soutenue le 26 JUIN 1970

JURY : MM. les Professeurs P.MALANGEAU, Président
J.R. BOISSIER
M.GUERNET Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. MALANGEAU P.	Doyen
M. GUILLOT M., O +	Assesseur
M. DELAVEAU P.	Assesseur
M. RODTNEAU L., +	Secrétaire Général
Mme FERRARI S.	Attaché Principal d'Administration Universitaire Adjointe au Secrétaire général
M. BRENN A., +	Attaché Principal d'Intendance Universitaire
M. TRICAN J.N.	Attaché Principal d'Administration Universitaire
M. JEANDEL L.	Attaché d'Administration Universitaire
Mme ESPINASSE M.L.	Attaché d'Administration Universitaire
M. JACOB +	Attaché d'Administration Universitaire
Mme MUR A.M.	Attaché d'Administration Universitaire
Mlle FRIZOL F.	Attaché d'Administration Universitaire

DOYEN HONORAIRE

M. VALETTE Guillaume, O +

PROFESSEURS HONORAIRES

M. LAUNOY L., O +
M. FLEURY P., O +
M. PICON M., O +

PROFESSEURS

M. JANOT M.M., O + Membre de l'Institut	Pharmacie Galénique (T)
M. VALETTE G., O +	Pharmacodynamie (T)
M. PARIS R., O +	Matière Médicale (T)
M. GUILLOT M., O +	Physique (T)
M. GAUTIER J.A., O +	Chimie Organique (T)
Mlle LAMBIN S., +	Microbiologie (T)
M. RAOUL Y., +	Physiologie (T)
M. COURTOIS J., +	Chimie Biologique (T)
M. DOMANGE L., O +	Chimie Générale et Minérale (T)
M. TRUHAUT R., O + Membre de l'Institut	Toxicologie & Hygiène Industrielle (T)
M. MORETTE A., +	Hydrologie (T)
M. CAVIER R., +	Parasitologie (T)
M. QUEVAUVILLER A. +	Hygiène & Educ. Sanitaire (T)
M. MOREAU R. +	Pharmacie Chimique (T)
M. GERMAN A.	Microbiologie (T)
M. PIETTE M., +	Hématologie (T)
M. MALANGEAU P.	Chimie Analytique (T)
M. GIRARD M., +	Biochimie Appliquée (T)
M. DILLEMANN G.	Législation, Déontologie et Hist. de la Pharmacie (T)
M. DEYSSON G., +	Botanique (T)
M. FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
M. RENAULT J.	Chimie Organique (T)
M. LE HIR A.	Pharmacie Galénique (T)
M. BOUDENE C.	Toxicologie & Hygiène Industrielle (T)
M. LARUELLE P.	Physique (T)
M. ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie (T)
M. MANGEOT A.	Pharmacie Galénique Industrielle (T)
M. DELAVEAU P.	Séméiologie & Pathologie Générale (T)
M. COHEN Y.	Pharmacodynamie (T)
M. RENAULT H.	Physique
M. BOURDON R.	Chimie Analytique
M. REYNAUD P.	Pharmacie Chimique
M. LE MOAN R.	Toxicologie
M. POISSON J.	Pharmacie Galénique
M. MICHEL R.	Endocrinologie (T)
M. LECLERC M.	Hématologie
M. PERCHERON F.	Chimie Biologique
M. SAVEL J.	Biologie Animale
M. DESVIGNES A.	Cryptogamie & Technique Bactériologique

MAITRES DE CONFERENCES

M. PAOLETTI C. — Toxicologie
M. BORY J. — Microbiologie
M. MIOCQUE M. — Chimie Organique
M. GUICNARD J.L. — Botanique Générale
M. GOUNELLE J.C. — Physiologie
M. BINET P. — Biologie Animale
M. COMBET FARNOUX C. — Chimie Organique
M. PLAT M. — Chimie Analytique
Mme PLAT M. — Législation & Déontologie Pharmaceutique
M. DELACOUX E. — Pharmacie Chimique
M. CAVE A. — Matière Médicale
M. PUISIEUX F. — Pharmacie Galénique
M. DUCHON D'ENGENIERES M. — Chimie Organique
M. ADOLPHE C. — Physique
M. GUERNET M. — Chimie Analytique
M. DIDRY J. — Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales
M. KHODADAD P. — Chimie Minérale
M. PERLES R. — Chimie Biologique
M. LEMONNIER A. — Biochimie Appliquée
M. YONGER J. — Chimie Analytique
M. HAMON M. — Chimie Analytique
M. MESTRE J. — Botanique
M. AGNERAY J. — Biologie
M. DREUX C. — Biochimie Appliquée
M. RIVET J. — Chimie Générale et Minérale
M. ETIENNE J. — Mathématiques
M. HAZEBROUCQ G. — Physique
M. ROUSSELET F. — Chimie Analytique
M. BOURRINET P. — Hygiène
M. SOULEAU Ch. — Chimie Générale et Minérale
Mme HUBERT J. (délég.) — Microbiologie
Mlle BOURNIQUE C. (délég.) — Botanique

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. GESTEAU P., +
M. GUERIN H., +
Mme HARISPE M.,
Mlle LONGUEVALLE S.
M. HARISPE, +

CHEFS DE TRAVAUX

M. ANDRE Guy, dél. — TP Pharmacie Galénique 2 - 3 A.
M. ADAM Yves, tit. — TP Pharmacie Chimique 5e A (Synthèse Médicaments)
M. AYMARD Pierre, tit. — ED Physiologie - Histologie
Mlle BARNIER S., dél. — Mathématiques
Mlle BENOIS M., dél. — TP Botanique 2è A
Mlle BERNARD J., tit. — TP Bactériologie 5èA - Industrie
M. BESANCON P. stag. — Mathématiques
Mme BLANC J., tit. — ED Chimie Organique 1 - 2 A
Mme BONALY J., dél. — ED Botanique 1 A
Mme BOSIO A.M., dél. — TP CHimie Qualitative
M. BOURLIOUX P., dél. — CES Bactériologie
M. BOY P., dél. — Mathématiques
M. CAILLARD C., dél. — TP Pharmacodynamie 4-5A
M. CANAL J., dél. — ED et TP Biochimie Appliquée 5 A.
M. CARRE D., dél. — Mathématiques
Mlle CARRERE C., tit. — TP Microbiologie 4 A
M. CEOLIN René, dél. — ED Chimie Minérale 1 A
Mme CENAC J., tit. — CES Parasitologie
Mme CHARDENOT P., tit. — Chimie Biologique 3-4A
Mme CHARPENTIER M., tit. — ED Chimie Générale & Minérale 1 A
M. CHERON J-M., dél. — TP Chimie Biologique 3 - 4 A
Mlle CLAIR G., tit. — ED Matière Médicale 3 - 5 A
M. DAGRON CHr., tit. — ED Chimie Générale & Minérale 2 A
M. DAVY J., dél. — CES Biochimie
Mlle DECAUDIN M. Th., tit. — TP Parasitologie 4 A
M. DELATTRE J., dél. — DEPS Exploitation Biochimique
M. DELCOURT A., dél. — ED Botanique 2 A
M. DOUSSIN A., tit. — TP Chimie Analytique 5 A
Mlle DUCHENE D., dél. — CES Pharmacie Galénique Industrielle
Mlle DUMANT G., tit. — CES Analyse physico-chimique des médicaments
Mme DUPONT Ch., tit. — CES Pharmacodynamie
M. ETIENNE Guy, tit. — TP Pharmacie Galénique 2 - 3 A
Mme FAURE L., stag. — ED Chimie Organique 1-2 A
Mlle FLEURY S., tit. — ED Chimie Analytique Quantitative
Mlle FOGLIETTI M.J., tit. — TP Chimie Biologique 3 - 4 A
M. GAIRARD Alexis, dél. — CES Contrôle médicaments (biologie)
M. GAYRAL Ph., dél. — TP Zoologie 1 A

CHEFS DE TRAVAUX (Suite)

Mlle GERMAN F., dél.	Mathématiques
M. GIRARDEAU J. F., dél.	TP Chimie Organique 5A (Synthèse Organique)
M. GOBERT J., stag.	TP Zoologie 1 A
Mlle GOURSAT M.J., tit.	ED Botanique 1 A
M. GROSSIORD J. L. dél.	TP Physique 1 A
Mlle GUILLOUX E., dél.	TP Chimie Biologique 3 - 4 A
M. HENRY J., tit.	Essais médicaments chimiques et galéniques
Mme JULIEN M., tit.	ED Physique 2 A
M. JULIEN R., tit.	ED Chimie Minérale 1 A
Mlle JUND Y., tit.	CES Microbiologie et contrôle médicaments-Microbiologie
M. LALEGERIE P., stag.	CES Biochimie
M. LAROCHE J., tit.	TP 5 A - Secourisme - Hygiène - Educ. Sanitaire
Mme LEDUC Y., tit.	TP Chimie Analytique Qualitative
M. LEGENDRE L., dél.	TP Chimie Organique 2 A
Mme LEGER N., tit.	Parasitologie 5 A
M. LELUC R., tit.	CES Bactériologie
M. LEMAY R., tit.	CES Législation
M. LEPAREUR C., dél.	Mathématiques
Mme LE QUANG THUAN stag.	TP Chimie Analytique Qualitative
M. LEVILLAIN P., tit.	ED Chimie Analytique Qualitative
Mme LEVY F., dél.	ED Botanique 2 A
M. LIKFORMAN J., tit.	ED Physique 1 A
Mlle LONGEVIALE M. tit.	ED Botanique 1 A
M. MAHUZIER G., tit.	TP Chimie Analytique Quantitative
M. MANDEREAU J., tit.	CES Pharmacotechnie Chimique
M. MANET L., stag.	CES Biochimie
M. MARTIN-FRERE H. tit.	TP Chimie Générale & Minérale 1 A
M. MAUGUEN Y., dél.	Mathématiques
Mme MAYRARGUE J., dél.	ED. Chimie Organique 1 - 2 A
Mlle MICHELET A., tit.	ED Chimie Générale et Minérale 2 A
M. MOULIN P., dél.	TP Physique 1 A
Mme MOURY J., stag.	TP Zoologie 1 A
Mme NOTTEGHEM M. J. tit.	ED Parasitologie 4 A
M. NGUYEN Phu Lich, dél.	CES Toxicologie
Mme PANOUSE J., tit.	CES Microbiologie - Virologie - Immunologie
Mme PAOLAGGI F., stag.	CES Electrochimie (Biochimie Appliquée)
M. PESTIS J., tit.	TP Anatomie, Physiologie Humaine
Mme PIETTE C., tit.	CES Hématologie 5 A - Biologie
M. POULLAIN P., tit.	CES Hématologie 5 A - Biologie
M. POUSSET J. L., tit.	TP Chimie Extractive 5 A
M. QUENEZ P., tit.	TP Chimie Générale et Minérale 1 A
Mme RABIANT O., dél.	ED Chimie Analytique Qualitative
M. RABARON A., dél.	CES Pharmacotechnie Galénique
Mme ROBERT M., tit.	CES Immunologie - Microbiologie
M. RODIER N., dél.	ED Physique 2 A
Mlle ROLLEN A., tit.	TP Botanique 1 A
Mlle ROUSSELET R., tit.	Essais médicaments végétaux
Mme RUDLER M., dél.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Mme SALES N., stag.	TP Physiologie, Histologie
Mlle SEBASTIEN F., dél.	TP Microbiologie 5 A (Biologie Officine)
M. SCHUSTER J., tit.	Essais des médicaments chimiques et galéniques
Mlle SORIA C., stag.	Biologie Officine 5 A
Mme SEILLER M., tit.	TP Pharmacie Galénique Industrielle
Mlle STRUPLER N., tit.	ED Chimie Générale et Minérale 1 A
M. TOUBOUL J. P., dél.	TP Chimie Analytique 5 A
M. TRIEU Thuang Cong tit.	TP Chimie Analytique Quantitative
Mlle TROUPEL S., stag.	TP Chimie Analytique Quantitative
MME VAN AMERONGEN G., dél.	ED Chimie Analytique Quantitative
M. VAYSSIERE J. M. dél.	ED Chimie Organique 1-2 A
M. VILLERS J., tit.	TP Physique 2 A
Mme WELBY J., dél.	TP Pharmacie Galénique

BIBLIOTHEQUE

Mlle RUYSSEN Y. +	Conservateur en Chef	Mlle LANGLOIS C.	Conservateur
Mme DESGRIPPES A.	Conservateur	N...	Conservateur
Mme COULET M. A.	Conservateur		

Légion d'Honneur
+ Chevalier
O Officier
C Commandeur

PARIS, le 6 Janvier 1970

A MA FEMME

A Monsieur le Doyen P. MALANGEAU

qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse, en témoignage de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Jacques R. BOISSIER

qui nous a servi de guide tout au long de notre travail, nous communiquant son dynamisme et son enthousiasme incomparables.

Nous lui sommes très reconnaissants de l'intérêt qu'il nous a témoigné à tout moment, de ses conseils toujours très opportuns et d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Nous lui témoignons notre plus sincère admiration et notre grande reconnaissan

A Monsieur le Professeur Agrégé Michel GUERNET

Ce chercheur, aux conseils scientifiques d'une inestimable valeur et à la très grande chaleur humaine nous a fait sentir à chaque moment son profond respect de l'Homme.

A ses côtés, nous avons appris que la science s'appuie à la base sur le sens commun et que c'est seulement à partir de celui-ci que le dynamisme de l'intelligence peut s'élaborer.

Nous le remercions d'avoir bien voulu faire partie de notre Jury de Thèse.

Que ce soit le témoignage de notre reconnaissance, de notre admiration et de notre affection.

A Monsieur le Docteur Jean-Paul TILLEMENT

Par la polyvalence et la curiosité qui le caractérisent, il nous a enseigné à ne pas canaliser notre intérêt scientifique dans une seule voie.

Sa ténacité a été pour nous une stimulation constante.

Que ceci soit le témoignage de notre reconnaissance et de notre amitié.

A Madame le Docteur Marie-Claude PIARROUX

Nous la remercions de son enseignement, de ses conseils et de l'intérêt qu'elle n'a cessé de nous prodiguer

Que ceci soit le témoignage de notre reconnaissance et de notre amitié.

A Mademoiselle le Maître ès sciences Arielle DIEHL

Son esprit de collaboration, son jugement critique et sa franchise ont été pour nous une aide scientifique et morale d'une très grande valeur.

Que ceci soit le témoignage de notre reconnaissance et de notre affection.

A Madame M.C. BARRIT

A Madame D. COUDERT

A Madame M. MARETTE

A Madame D. SEGRETTIN

A Madame F. THENINT

Nous remercions chacun des collaborateurs de Monsieur le Professeur J.R. BOISSIER de l'Unité 19 de l'I.N.S.E.R.M., de leur apport à cette ambiance d'amitié et de travail qui nous a entouré et nous a soutenus lorsque notre courage fléchissait, à plus d'une occasion.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE 3

Chapitre I: principales méthodes de dosage de l'Histamine 5

a. Introduction : propriétés de l'histamine 5

b. Méthodes utilisées : 7
déprotéinisation 8
purification 8
dosage proprement dit 10
- méthodes biologiques 11
- méthodes isotopiques 12
- méthodes chimiques 12

c. Conclusion 15

Chapitre II : Etude du dosage fluorimétrique de l'histamine dans le système nerveux central 17

a. Techniques utilisées 17
- préparation des échantillons 17
cerveau entier 17
différentes régions 18
fractions : histamine libre et liée 21
discussion 21

- déprotéinisation 22
- purification 23
- dosage fluorimétrique 24

b. Discussion 25
- déprotéinisation 25
- étude critique de la méthode de purification 25
- fluorescence 30

DEUXIEME PARTIE 35

Chapitre I : Histamine dans le Système Nerveux Central chez différentes espèces 37

1. Cerveau entier 37
2. Répartition régionale 39

Chapitre II : Histamine "libre" et "liée" 47

1. Cerveau entier 47

2. Répartition régionale 48

Chapitre III : Variations de l'histamine cérébrale en fonction de l'âge 51

1. Cerveau entier 51
- Discussion 55

2. Répartition régionale 59
- Discussion 62

CONCLUSIONS 65

BIBLIOGRAPHIE I à XXI

INTRODUCTION

Les premières études sur l'histamine dans le système nerveux central ont été effectuées par KWIATKOWSKI, en 1943 (92). Depuis cette date, les travaux se sont multipliés, mais les résultats obtenus sont très souvent divergents. Les taux rapportés pour le tissu nerveux varient entre 40 ng et quelques µg de tissu frais. Ces divergences sont liées aux difficultés inhérentes au sondage de cette amine. Les principales difficultés ont essentiellement pour origine :

1) La faible concentration de l'histamine dans le système nerveux central

2) Le manque de spécificité des méthodes de mesure : le système nerveux central renferme de nombreuses substances capables d'interférer. Il en résulte qu'une soigneuse purification de l'amine est nécessaire.

3) Le manque de sensibilité des méthodes chimiques. Néanmoins, en 1959, la méthode fluorimétrique de SHORE (147) a apporté une grande amélioration. A partir de cette date, les méthodes colorimétriques ont été abandonnées.

Toute recherche sur le métabolisme de l'histamine et sur sa fonction dans le système nerveux central doit être précédée de l'étude approfondie de la technique de dosage qui sera mise en oeuvre de manière à en déterminer toutes les possibilités et les limites : elle doit, tout en étant suffisamment précise, permettre des dosages en série.

Ce travail est divisé en deux parties :

1°) L'étude et la mise au point d'une technique spectrofluorimétrique. Cette étude envisage plus particulièrement la purification de l'histamine, à partir du système nerveux central, de manière à pouvoir appliquer la réaction fluorimétrique de SHORE en l'absence complète de substances interférentes.

2°) Une détermination des paramètres physiologiques : concentrations de l'amine chez différentes espèces, répartition dans les différentes régions cérébrales, localisation subcellulaire et variations de concentration en fonction de l'âge. La connaissance de ces paramètres doit précéder toute recherche approfondie sur le rôle physiologique de l'histamine.

1ère PARTIE

CHAPITRE I : Principales méthodes de dosage de l'Histamine

CHAPITRE II : Etude du dosage fluorimétrique de l'Histamine dans le système nerveux central.

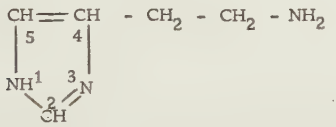
CHAPITRE I

PRINCIPALES METHODES DE DOSAGE DE L'HISTAMINE

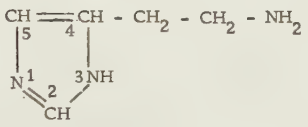
INTRODUCTION

Avant d'exposer les principales méthodes de dosage de l'Histamine, il est nécessaire de rappeler très succintement les principales propriétés de cette amine sur lesquelles ils reposent.

L'Histamine,4 (ou 5)-2-aminoéthyl imidazole,se représente selon les formules I et II



I



II

en raison de la présence de deux doubles liaisons en résonance.

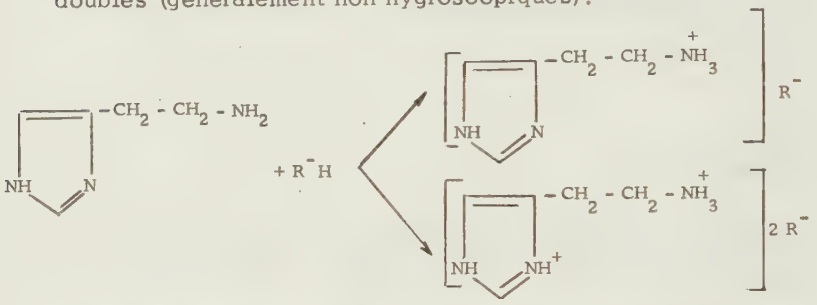
Propriétés physico-chimiques :

L'Histamine $C_5H_9N_3$ d'un poids moléculaire de 111,15, possède un caractère hygroscopique. Elle est soluble dans l'eau, l'alcool, le chloroforme chaud, le butanol, l'alcool isoamylique et le n-heptanol, mais insoluble dans l'éther, le benzène et le n-heptane (69).

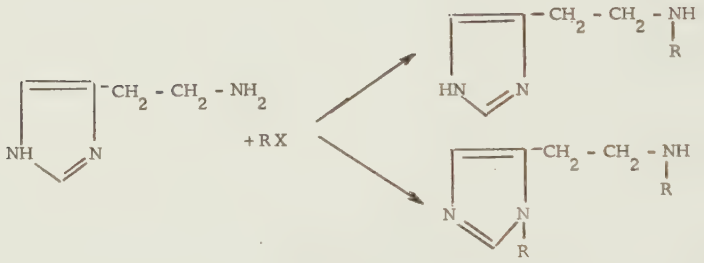
La molécule possède 3 atomes d'azote dont deux seulement sont protonisables (5). L'atome d'azote situé sur la chaîne latérale présente le caractère le plus fortement basique (pKa:9,76) (64). Seul, l'atome d'azote intracyclique le plus éloigné de la chaîne latérale possède encore une légère polarité basique (pKa:5,76) (64) alors que le troisième n'est pas réactif.

La molécule possède donc un caractère basique prononcé. En particulier :

- il en résulte une bonne solubilité dans l'eau en milieu acide, alors qu'en milieu alcalin cette amine est facilement extraite par les solvants organiques ;
- elle est retenue par les résines échangeuses d'ions à caractère acide ;
- elle réagit avec : les acides pour donner des sels simples ou doubles (généralement non hygroscopiques) :



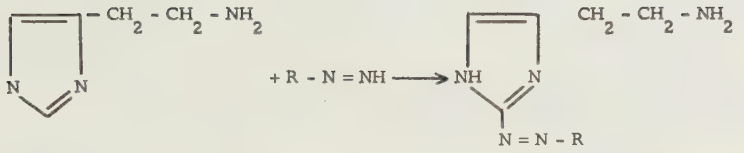
- les dérivés halogénés pour donner des composés mono ou bi-substitués :



- les aldéhydes pour donner des bases de SCHIFF :
  $R - NH_2 + R'-CHO \rightarrow R - N = CH-R'$
- les ions métalliques (Ag, Cu, Zn), pour donner des complexes tels que :

  $Ag\left[(C_5H_9N_3)_2\right]NO_3$, H_2O et $(C_5H_9N_3)_2\ Zn$ (135)

D'autres réactions sont liées à la nature du noyau imidazole. En particulier, elle réagit avec les amines aromatiques diazotées pour donner divers composés colorés :



L'Histamine présente une bonne stabilité vis à vis des réactifs courants. Cependant un milieu fortement alcalin et à chaud, une dégradation de la molécule peut intervenir.

Propriétés pharmacologiques :

Les propriétés pharmacologiques sont très nombreuses. Il est possible de résumer celles susceptibles d'être utilisées en vue d'un dosage :

- chute de la pression artérielle chez le chat (méthode de DALE (34).
- contraction des bronches sur poumon isolé et perfusé de cobaye (méthode de KONZETT et RESSLER (86).
- contraction des muscles de l'intestin grêle (méthode de BARSOUM et GADDUM (15).

METHODES UTILISEES POUR LE DOSAGE DE L'HISTAMINE DANS LE TISSU NERVEUX -

Etant donné l'impossibilité d'un dosage direct de l'histamine contenue dans les tissus et les liquides biologiques, il est nécessaire au préalable d'extraire et de purifier cette amine.

Une technique de dosage dans sa forme la plus complète comprend les phases suivantes :

A) Déprotéinisation (Première extraction)
B) Purification (Deuxième extraction)
C) Dosage proprement dit

Ces phases de déprotéinisation et d'extraction sont souvent communes à plusieurs techniques. Elles feront l'objet d'une description générale, sans entrer dans les détails proposés par les différents auteurs.

Le dosage proprement dit fait appel à des techniques très différenciées. En conséquence, la classification des principales méthodes

repose sur la nature de ces dosages.

A) Déprotéinisation

Cette déprotéinisation est plus ou moins poussée suivant la nature du réactif précipitant.

Après homogénéisation, la suspension obtenue est filtrée ou centrifugée, le filtrat ou le liquide surnageant est récupéré pour une purification ultérieure. Quelques techniques soumettent l'homogénéisat à une ébullition en milieu acide, afin de libérer l'histamine éventuellement liée aux protéines ou à d'autres macromolécules (52) (68). Cette technique a été discutée en raison de la décarboxylation possible de l'histidine (66) (146).

La plupart des réactifs déféquants habituellement utilisés en biochimie ont été proposés : acides phosphotungstique (62), métaphosphorique (97), chlorhydrique (52) (68), trichloracétique (130) (137), perchlorique (147) (114), hydroxyde de zinc (84), sulfate de zinc (165), solutions salines diverses à forte concentration (101), ou alcools (133) (méthanol, éthanol, butanol).

B) Purification

La solution provenant de la déprotéinisation renferme de nombreuses substances pouvant interférer dans le dosage final.

Il est donc nécessaire d'effectuer une purification. La technique mise en oeuvre dans cette deuxième étape doit tenir compte :

- de la nature du tissu ou du liquide biologique analysé
- du mode de déprotéinisation préalablement mis en oeuvre
- de la technique du dosage final.

Les différentes méthodes proposées peuvent être classées en deux grands groupes distincts :

a. Extraction par des solvants organiques
b. Extraction par chromatographie sur échangeurs d'ions.

Cependant, certains auteurs utilisent simultanément ces deux méthodes.

a. Extraction par solvants organiques

Dans un premier temps, l'histamine est déplacée par une base forte en présence d'une forte concentration saline et extraite par un

solvant organique non miscible (alcool butylique, alcool amylique ou isomylique, alcool n-heptylique). Le nombre d'extraction varie suivant les auteurs (85) (62) (14) (159) (153) (133) (147) (20) (131) (11) (161) (172).

Dans un deuxième temps, une extraction par une solution aqueuse acide (le plus souvent en milieu chlorhydrique) achève la purification.

Toutes les techniques qui utilisent ce mode de purification donnent des résultats supérieurs aux taux actuellement considérés comme normaux, à l'exception de celle de ANTON et SAYRE (11), employant l'alcool isoamylique.

b. Extraction par chromatographie sur échangeurs d'ions

Du fait de la présence de deux groupements basiques dans la molécule d'histamine, celle-ci est susceptible d'être retenue par les résines à caractère acide alors que les résines à caractère basique n'auront aucun pouvoir de rétention.

1) Résines à caractère basique

En milieu convenablement tamponné, ces résines fixent les composés à polarité acide (acides organiques et acides aminés) ; l'histamine n'est pas retenue.

Pour les dosages biologiques, des résines à groupements fonctionnels ammonium quaternaire (Dowex 1 et Amberlite IR 410) donnent de bons résultats (87). Cependant, pour les dosages chimiques, ce mode de purification ne donne pas satisfaction (164) (87). Il est nécessaire d'effectuer une chromatographie ultérieure sur une résine à caractère acide. Les résines à caractère faiblement basique ne sont pas utilisées.

2) Résines à caractère acide

Ces résines sont susceptibles de fixer tous les composés possédant des groupements aminés (amines ou aminoacides) ; leur utilisation comporte deux phases successives :

1. Fixation
2. Elution

A ces deux stades le pH et la force ionique des solutions doit tenir compte :

- de la nature du groupement actif de la résine
- du pK de l'amine à isoler.

Il en résulte que la sélectivité est plus grande avec les résines faiblement acides (à groupement carboxylique ou phosphorique) qu'avec les résines fortement acides (à groupement sulfonique).

Bien que l'utilisation de résines fortement acides (Dowex 50 W) ait donné des résultats satisfaisants pour des dosages fluorimétriques sur le SNC (54) (55) (122), celles-ci sont à l'heure actuelle peu employées.

Les résines carboxyliques (Amberlite CG-50, IRC-50, XS-64) sont largement utilisées et les meilleurs résultats font appel à des techniques biologiques. Avec les méthodes fluorimétriques, les résultats sont très variables et toujours trop élevés (1) (2) (22) (23).

Certains auteurs ont proposé d'augmenter la sélectivité en mélangeant ces résines avec de la cellulose (2).

La cellulose phosphorylée (Cellex P) fournit une bonne sélectivité (90) (107) (110) (112) (129), mais présente une faible capacité d'échange (moins de 1 mE/g). Cependant, il faut noter une certaine fragilité de la chaîne cellulosique : en solution, il peut se produire des ruptures de la trame cellulosique entraînant quelques modifications dans son comportement. Récemment, pour remédier à ces inconvénients mineurs,MICHAELSON et coll. (114) ont proposé l'utilisation de Duolite ES63, possédant des groupements phosphoriques : cette résine d'une capacité élevée (6,5 mE/g) est d'une bonne stabilité. Cependant, il semble que cette dernière résine nécessite un volume d'élution plus important que la Cellex P : il en résulte une perte de sensibilité.

c. Méthodes mixtes

Chacune des méthodes décrites précédemment possède des inconvénients que certains auteurs ont tenté d'éliminer en procédant à deux extractions successives, soit par utilisation conjointe d'un solvant et d'une résine (94) (107) (111) (53), soit par utilisation successive de résines basique et acide (87) (98) (94) (90).

La seule méthode donnant des résultats satisfaisants procède à une extraction butanolique, suivie d'une chromatographie sur Cellex P et dosage fluorimétrique final (107).

C) Dosage proprement dit

Les principales méthodes de dosage peuvent être classées en trois groupes distincts :

a. Méthodes biologiques basées sur l'activité pharmacologique de l'histamine sur des organes isolés.

b. Méthodes isotopiques

c. Méthodes chimiques, basées sur la formation de dérivés colorés ou fluorescents.

A l'heure actuelle, les méthodes chimiques utilisant la spectrophotométrie de dérivés colorés sont délaissées.

a. Méthodes biologiques

Ces méthodes sont basées sur la mesure de la contraction des muscles isolés sous l'action de l'histamine (l'iléon de cobaye fournit les meilleurs résultats). L'amplitude des contractions est proportionnelle au logarithme de la concentration en histamine (24) (32).

Il existe deux techniques principales :

1) La technique la plus ancienne par perfusion dans laquelle l'organe est immergé alternativement dans des solutions physiologiques et des solutions contenant des doses variables d'histamine (15).

2) La technique plus récente de superfusion dans laquelle la solution physiologique contenant des doses variables d'histamine ruisselle sur l'organe placé sur une chambre thermostatée (50).

Il est nécessaire d'effectuer une déprotéinisation et une extraction préalables suivant les techniques générales décrites précédemment.

La défécation suivie d'une ébullition a été discutée dans le cadre de ces dosages biologiques : elle élimine les substances susceptibles d'interférer du fait de leur activité pharmacologique (acétylcholine, 5HT, polypeptides : angiotensine, ocytocine, vasopressine, bradykinine, substance P etc...).

Pour l'extraction, solvants et résines ont été largement utilisés. CARLINI et GREEN ont en 1963 (23) présenté une discussion de la valeur de ces différentes techniques.

Il est à remarquer qu'une méthode d'extraction valable pour un dosage biologique n'est pas forcément adaptable à un dosage chimique (22) (88).

Ces méthodes biologiques furent les premières utilisées. Malgré l'apparition des méthodes chimiques qui présentent une sensibilité au moins égale, elles n'ont pas été abandonnées (22) (23) (4) (33) (25). Les résultats obtenus par ces méthodes semblent très variables d'un auteur à l'autre pour un même tissu (161 bis).

b. Méthodes isotopiques

La méthode radioisotopique consiste à préparer un dérivé radioactif de l'histamine par action du chlorure de p-iodo sulfonyle, marqué à l'iode 131 (chlorure de pipsyle). La technique décrite par SCHAYER et coll. (137), dérivé de celle de KESTON et coll. (82) proposée pour le dosage des aminoacides. L'échantillon est traité avec le réactif radioactif dans des conditions qui fournissent 93-96 % de rendement en dipipsyl-histamine. Ce dérivé radioactif est extrait du milieu réactionnel, mélangé avec une quantité connue de dipipsyl-histamine non marquée ; il est purifié et cristallisé jusqu'à radioactivité spécifique constante. La quantité totale d'histamine présente dans l'échantillon est calculée à partir des données suivantes : activité spécifique du chlorure de pipsyl, activité spécifique (constante) de la dipipsyl-histamine, quantité de dipipsyl-histamine ajoutée et quantité finale de produit cristallisé.

La méthode enzymatique isotopique (155) procède par incubation de l'organe avec de l'histamine tritiée, de la S-adénosyl méthionine marquée au carbone 14, et de l'histamine méthyl-transférase.

Après extraction de la méthyl histamine formée, la radioactivité due au ^{3}H et au ^{14}C est déterminée. Du rapport de la radio-activité ^{14}C sur ^{3}H, on déduit la teneur en histamine initialement présente dans l'organe.

Cette méthode présente une très grande sensibilité (de l'ordre de 2 ng).

Ces méthodes sont très sensibles et très spécifiques à la condition que la purification soit très soignée. Malheureusement elles se prêtent difficilement, sous cette forme, à des dosages en série.

c. Méthodes chimiques

Les méthodes chimiques font appel, soit à la spectrophotométrie de dérivés colorés de l'histamine, diazodérivés ou dérivés du dinitrofluorobenzène (DNFB), soit à la spectrofluorimétrie du produit de condensation avec l'o-phtalaldéhyde (OPT).

1. METHODES COLORIMETRIQUES

a/ Diazométhodes

Elles sont basées sur la propriété du noyau imidazole : celui-ci se condense avec les amines aromatiques pour donner des produits colorés (132) (119).

Ces dérivés colorés sont susceptibles d'être :

- soit révélés en chromatographie avec une grande spécificité : cependant l'évaluation quantitative est difficile (144) (152)

- soit dosés par des méthodes spectrophotométriques (130) (10).

Les "diazométhodes" furent utilisées dès 1914 pour le dosage de l'histidine (163) et un peu plus tard, en 1919 (85), pour celui de l'histamine et des imidazoles en général (165) (16).

Les deux inconvénients de cette méthode sont :

- la non spécificité de la réaction : les imidazoles, les phénols (130) et les amines aliphatiques (121) forment aussi des produits colorés.

- l'instabilité des produits colorés (14) (48).

D'autre part la structure des dérivés colorés n'est pas bien déterminée ; il s'agit probablement de dérivés mono ou disubstitués sur l'atome de carbone 2 du noyau imidazole (83).

La première méthode ayant présenté une spécificité et une sensibilité satisfaisante fut celle décrite par ROSENTHAL et THABOR (1948) (130).

Ils introduisent l'usage de la p-nitro-aniline, l'extraction du dérivé coloré avec la méthyl-isobrithyl-cétone et le lavage de la solution cétonique avec un tampon barbital à pH 7,7. Ce dernier lavage évite l'interférence due à l'ammoniaque et à d'autres dérivés.

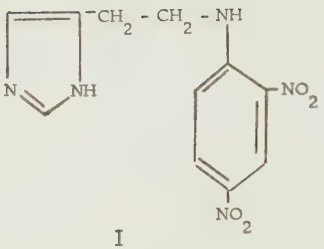
On peut considérer la méthode de ROSENTHAL et THABOR comme la méthode type des "diazométhodes".

Toutes les méthodes proposées ultérieurement correspondent à des modifications peu importantes de cette technique (97) (73) (121) (153) (145) (133) (158) (48) (58).

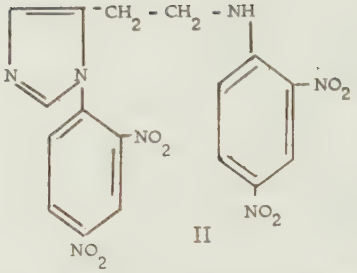
β) Méthodes au DNFB

Par extension de la méthode de dosage des amino acides décrite par SANGER en 1945 (134), Mc INTIRE et coll. en 1950 (102) et LOWRY et coll. en 1954 (96) dosent l'histamine dans le sang total ou le plasma.

Toutes les méthodes au DNFB (34) (71) (41) (67) (171) (165) sont basées sur le même principe : la présence de deux groupements basiques sur le noyau imidazole d'une part et sur la chaîne latérale d'autre part, permet la condensation d'une molécule d'histamine avec 1 ou 2 molécules de dinitrofluorobenzène (DNFB) pour donner le composé I ou le composé II.



I



II

Pour un bon déroulement du dosage, il faut se placer dans des conditions telles que la formation du dérivé monosubstitué (I) soit maximale par rapport à celle du dérivé disubstitué (II).

Il est nécessaire avant la lecture spectrophotométrique d'extraire le dérivé monosubstitué.

Cette extraction se divise elle-même en deux temps :

- Extraction par un solvant organique

- Passage en milieu aqueux acide ; le dérivé I, dont un seul des groupements basiques de l'histamine est combiné, est susceptible de donner un sel, extractible en milieu aqueux.

Les méthodes colorimétriques présentent des inconvénients majeurs qui peuvent être résumées :

1. Une purification préalable est impérative

2. La réaction colorée présente une mauvaise spécificité

3. Une purification du dérivé coloré est nécessaire

4. La sensibilité est médiocre (de l'ordre de 100 ng dans la prise d'essai). Ce dernier inconvénient élimine la possibilité de l'utilisation de cette méthode dans l'étude de l'histamine cérébrale chez les petits animaux.

2. METHODES FLUORIMETRIQUES

SHORE et coll. (147) ont en 1959, proposé un dosage fluorimétrique de l'histamine par condensation avec l'o-phtalaldéhyde (OPT).

Cette condensation qui se réalise en milieu alcalin donne naissance à un composé fluorescent (longueurs d'onde : excitation 360 nm, fluorescence 450 nm) dont la stabilité est maximale en milieu acide.

Tous les dosages fluorimétriques proposés utilisent ce dérivé. Les seules modifications apportées à la méthode de SHORE concernent le volume des réactifs, le temps de développement et la nature de l'acide utilisé (54) (90) (44) (11) (114).

L'OPT est susceptible de réagir avec d'autres dérivés aminés que l'histamine pour former des dérivés fluorescents dont les caractéristiques spectrales sont voisines de celles obtenues avec cette amine. Pour obtenir une bonne spécificité de la réaction, il est nécessaire d'effectuer une déprotéinisation et une purification préalables à la réaction de fluorescence.

- Pour la déprotéinisation, l'acide perchlorique est généralement utilisé ; l'excès est éliminé du milieu réactionnel par précipitation sous forme de perchlorate de potassium très peu soluble.

- La purification peut faire appel à différentes techniques :

a) Techniques de purification par solvants organiques :

La méthode de SHORE et coll. (147) utilise le n-butanol, saturé de Na Cl. Cette méthode fut longtemps employée. Tous les résultats obtenus avec cette technique sont trop élevés.

La méthode de ANTON et SAYRE (11) utilise l'alcool isoamylique et le chloroforme ; le Na Cl est remplacé par $K_2 H PO_4$. Cette méthode semble plus sélective. PEARCE et coll. (120) l'ont utilisée avec succès dans le cas du tissu nerveux.

b) Techniques de purification par chromatographie sur échangeurs d'ions : toutes les techniques précédemment décrites ont été utilisées.

c) Techniques d'extraction mixte :

Ces techniques utilisent successivement une extraction par solvants organiques et une chromatographie sur échangeurs d'ions.

L'examen critique de ces méthodes montre que les résultats obtenus sont comparables à ceux fournis par l'utilisation des échangeurs d'ions seuls. Il semble donc que l'extraction préalable soit d'une utilité très discutable.

Conclusion

Nous avons vu que les méthodes isotopiques nécessitent des purifications longues et délicates ; elles sont difficilement adaptables aux dosages en série.

Les méthodes biologiques font intervenir, par la nature même de

leur principe, des paramètres difficilement contrôlables. Les recherches d'une méthode chimique aussi sensible que la méthode biologique se sont multipliées jusqu'en 1959 ; c'est alors que la méthode fluorimétrique a été décrite.

Depuis cette date elle a été largement utilisée par un très grand nombre de laboratoires. Cependant, aucune méthode de purification de l'histamine dans le tissu nerveux, préalable au dosage fluorimétrique, n'a fait l'objet d'une étude générale ; de nombreuses purifications ont été proposées pour lesquelles l'étude de la sélectivité a souvent été négligée. Ceci nous a conduit, avant d'envisager le dosage spectrofluorimétrique de l'histamine, à reprendre une étude approfondie de la purification de cette amine.

CHAPITRE II

ETUDE DU DOSAGE FLUORIMETRIQUE DE L'HISTAMINE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Dans ce chapitre, nous décrirons les techniques utilisées ; les différentes étapes du dosage de l'Histamine seront traitées successivement:

1. Préparation des échantillons à doser
2. Déprotéinisation
3. Purification
4. Dosage fluorimétrique final

La dernière partie du chapitre concerne l'étude critique de la méthode proposée, en particulier du mode de purification.

TECHNIQUES UTILISEES

1. Préparation des échantillons à doser

a. Cerveau entier :

Les animaux sont pesés et sacrifiés par décapitation. La peau de la calotte crânienne est retirée. Les ciseaux sont introduits dans l'orifice médullaire, le découpage suit le bord externe de l'os temporal. La calotte crânienne est retirée. A l'aide d'une canule le cerveau est prélevé et déposé rapidement sur une plaque métallique réfrigérée par contact de sa face inférieure avec un mélange glace-sel.

Le temps compris entre la mort de l'animal et le dépôt du cerveau sur la plaque réfrigérée ne doit pas excéder 60 secondes. Le sang et les méninges sont soigneusement éliminés. Les cerveaux sont pesés et homogénéisés à la température de 0°C ; la conservation peut être effectuée à - 24°C.

b. Différentes régions cérébrales

La dissection du cerveau sur la plaque réfrigérée ne doit pas durer plus de 3 minutes. Pendant la dissection le tissu nerveux doit rester à une température inférieure à 4°C. Nous utilisons la technique de GLOWINSKI et IVERSEN (51) avec quelques modifications.

Sept régions (éventuellement 8) peuvent être obtenues.

1. Cervelet : Le cervelet est séparé du reste du cerveau par section des pédoncules cérébelleux.

2. Tronc cérébral : Le tronc cérébral est isolé par section des pédoncules cérébraux, puis séparé du reste du cerveau par section à la limite des corps mamillaires et de l'hypothalamus. La dénomination "tronc cérébral" désigne l'ensemble constitué par le bulbe, la protubérance annulaire et le mésencéphale (le thalamus étant exclu).

   Cette région peut être séparée en deux parties par une section verticale immédiatement en arrière des tubercules quadrijumeaux postérieurs, aboutissant sur la face ventrale en avant de la protubérance annulaire.

   Nous appellerons "cerveau moyen" la partie antérieure (mésencéphalique) et "bulbe" la partie postérieure comprenant bulbe et protubérance annulaire.

3. Hypothalamus : L'hypothalamus est isolé par section dans un plan vertical allant du chiasma optique à la commissure antérieure, le plan horizontal étant représenté par le toit du 3ème ventricule.

4. Hippocampe : L'hémisphère est posé sur sa face latérale : à l'aide d'une pince introduite dans le troisième ventricule, l'hippocampe situé le long du bord postérieur du cortex est prélevé après déroulement.

5. Thalamus : Une fois l'hippocampe prélevé, le thalamus apparaît sous forme d'une masse arrondie aisément séparable du pallidum sous jacent.

6. Corps striés : Les corps striés sont séparés du cortex en prenant comme limites en profondeur le corps calleux. La dénomination "corps striés" désigne l'ensemble constitué par le noyau caudé, le putamen et le pallidum.

7. Cortex : Il comprend la substance blanche (corps calleux) et la substance grise corticale.

La photo ci-contre montre les sept régions obtenues.

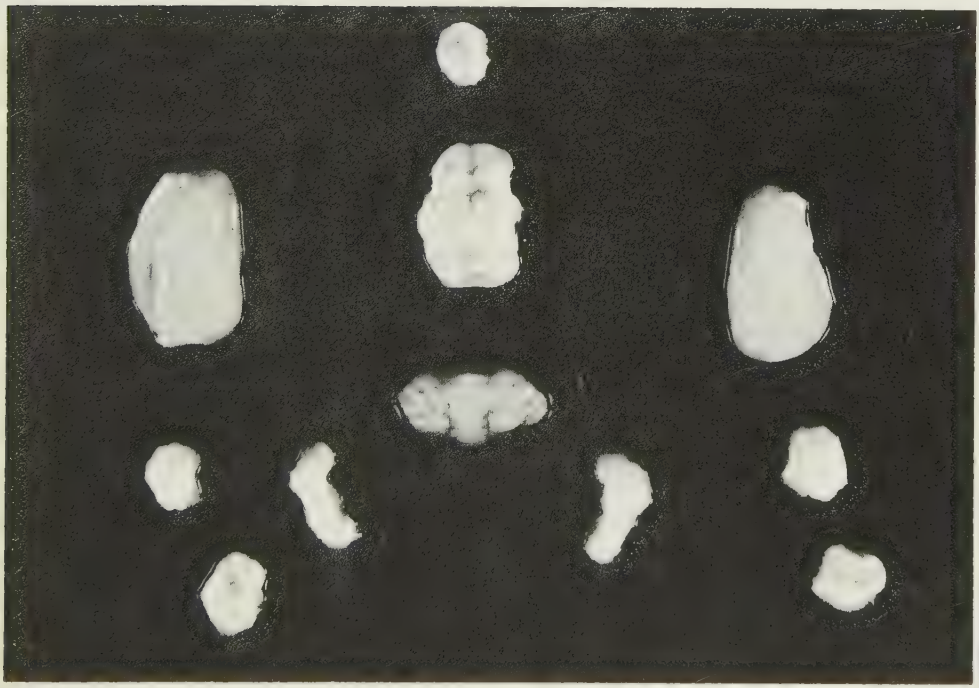
Comme pour les cerveaux entiers, les régions peuvent être utilisées ou bien conservées à - 24° C.

LES DIFFERENTES REGIONS CEREBRALES

Au centre et de haut en bas : HYPOTHALAMUS, TRONC CEREBRAL et CERVELET.

Sur les côtés et de haut en bas : CORTEX, CORPS STRIES et THALAMUS.

Entre ces deux groupes : HIPPOCAMPE.



c. Fractionnement par ultracentrifugation : Histamine"libre" et "liée"

Les cerveaux ou régions cérébrales qui viennent d'être obtenus sont pesés et homogénéisés dans 4 fois leur poids de solution isotonique de saccharose (0,32 M). Cette opération doit avoir lieu aussitôt le prélèvement effectué. Les tissus conservés par congélation ne peuvent être utilisés (59).

L'homogénéisation se réalise à l'aide d'un homogénéisateur de tissu type Potter (B. Braun) avec piston de téflon. L'espace entre le tube et le piston doit être de 0,25 mm.

L'homogénéisation d'une durée totale de 2 mn est effectuée en deux temps égaux, séparés d'une période de repos d'une minute pour obtenir une bonne réfrigération.

L'homogénéisat est centrifugé à 100.000 g pendant 60 mn à 2° C dans une ultracentrifugeuse Beckman Spinco (rotor type L. 50).

Le culot et le surnageant sont séparés par décantation.

d. Discussion

- La quantité de sang retenue dans le cerveau dépend de la technique de sacrifice de l'animal et du mode d'extraction.

Selon les travaux de VLADIMIROV (160), la technique que nous avons décrite donne la contamination sanguine la plus faible, de l'ordre de 1,2 % par rapport au poids de cerveau.

Etant donné les taux sanguins normaux d'histamine (100-300 ng/ml), dans les cas les plus défavorables, la contamination reste très faible et toujours inférieure à la précision des dosages utilisés.

Dans nos conditions expérimentales, le tissu nerveux est toujours maintenu à une température inférieure à +4°C, afin d'éviter au maximum l'action des enzymes.

Il n'a pas été observé de variations des taux d'histamine et d'histidine entre les cerveaux utilisés immédiatement après le prélèvement et les cerveaux conservés pendant plusieurs semaines à - 24° C.

- La technique de dissection de GLOWINSKI et IVERSEN (51) a été retenue parce qu'elle peut s'effectuer en un temps assez court, 2 à 3 mn: elle permet l'obtention de fractions faciles à différencier anatomiquement, gardant une unité fonctionnelle.

La reproductibilité de la dissection est objectivée par la faible dispersion des poids des différentes régions (jamais supérieure à 5 %).

- Pour l'obtention des fractions "histamine libre" et "histamine liée", nous nous sommes inspirés de la technique de fractionnement sub-cellulaire de KATAOKA et de ROBERTIS (79). L'histamine du culot se trouverait principalement à l'intérieur de synaptosomes ou liée à des macromolécules insolubles. L'histamine du surnageant est considérée comme l'histamine non contenue dans des structures particulières, ni liée à des macromolécules insolubles (109) (97).

Il n'est cependant pas exclu que la rupture mécanique éventuelle de certaines structures entraîne une augmentation de "l'histamine libre". Par conséquent, pour la bonne reproductibilité de la technique, il est nécessaire de travailler dans des conditions strictement standardisées (59).

2. Déprotéinisation

A) En milieu hydroalcoolique

Le tissu une fois pesé est homogénéisé avec 9 fois son poids d'éthanol à 74 % (V/V).

L'homogénéisat est centrifugé à 3×10^3 g à 0° C pendant 60 mn, puis laissé au repos pendant 12 h à 0° C. Le liquide surnageant est récupéré et dilué au demi à l'aide d'eau bidistillée. 0,5 ml de solution aqueuse d'EDTA à 2 % (P/V) est ajouté. Des solutions témoins, dénommées "blancs colonne" et des solutions étalon dénommées "étalons internes" sont préparées dans des conditions identiques à partir d'un même volume d'éthanol à 74 % (V/V). Les étalons contiennent des quantités connues d'histamine introduites sous forme d'une solution de cette amine à 1 µg/ml dans l'acide chlorhydrique 0,1 N. Dans la suite, solutions témoins et dosages seront traités parallèlement d'une manière identique.

Le pH est ajusté à $6,1 \pm 0,05$, à l'aide d'une solution de soude 0,1 N.

B) En milieu perchlorique

Cette déprotéinéisation est utilisée dans le cas du fractionnement "histamine libre" et "histamine liée". Après séparation du culot et du surnageant, ce dernier est additionné de la quantité d'acide perchlorique concentré 65 % (soit 6,5 N), calculée pour obtenir une concentration finale : 0,4 N. Les tubes sont agités. Le culot est repris par l'acide perchlorique 0,4 N remis en suspension et homogénéisé. Tous les tubes sont centrifugés à 3×10^3 g à 0° C pendant 30 mn.

Comme dans le cas de la déprotéinisation par l'éthanol, des blancs et des étalons internes sont préparés.

L'excès d'acide perchlorique est neutralisé par une solution d'hydroxyde de potassium. La plus grande partie du perchlorate de potassium précipite par repos pendant 12 heures à 0°C. Les cristaux sont éliminés par centrifugation à 3×10^3 g à 0° C pendant 10 mn.

Le liquide surnageant est séparé et additionné de 0,5 ml d'une solution aqueuse d'EDTA 2 % (P/V) et ajusté à pH 6,1 $\pm$ 0,05 à l'aide de soude 0,1 N.

3. Purification

A) Préparation des résines et des colonnes à chromatographie

a) L'Amberlite CG 50 (100-200 mesh) échangeur d'ions de type carboxylique, est lavé par agitation avec 5 fois son volume d'eau bidistillée. Après décantation, cette eau de lavage est rejetée. Cette opération est répétée 30 à 40 fois successives. La résine est ensuite traitée une fois de la même manière, à l'aide d'acétone, puis à nouveau lavée à l'eau bidistillée jusqu'à l'élimination de toute trace du solvant organique.

La résine est ensuite essorée et remise en suspension dans de l'eau bidistillée. Le pH est amené à 11 à l'aide de soude 10 N. (Il est nécessaire de vérifier que le pH reste stable pendant environ 1 heure après la dernière affusion de soude). Après 3 heures d'agitation, la résine est lavée à l'eau bidistillée jusqu'à obtention d'un liquide surnageant limpide présentant un pH d'une valeur constante (10,5 environ). La résine est agitée pendant une nuit dans l'acide chlorhydrique 3N, puis essorée et séchée. Elle est ensuite lavée à l'eau bidistillée jusqu'à l'obtention d'un liquide surnageant clair. Le lavage se poursuit à l'aide de tampon phosphaté 0,3 M à pH 6,1 jusqu'à ce que le surnageant présente un pH constant (6,1). Sa conservation s'effectue dans le tampon pH 6,1 au réfrigérateur.

b) La cellulose phosphorylée (Cellex P : Bio-Rad) est lavée suivant une technique identique à celle mise en oeuvre pour l'Amberlite CG50 : 20 fois dans de l'eau bidistillée, 20 fois dans un tampon phosphaté 0,2 M à pH 6,1 et 20 fois dans du tampon 0,03 M à pH 6,0 : la conservation s'effectue au réfrigérateur dans ce même tampon.

c) Colonne. La colonne se compose d'un tube en verre (0,4 cm de diamètre intérieur et 22 cm de hauteur) surmonté d'un réservoir cylindrique (diamètre 4 cm, hauteur 8 cm). L'extrémité inférieure de la colonne est effilée en un canal de 2 mm de diamètre. Avant d'introduire l'échangeur, un tampon de laine de verre est introduit dans la colonne et légèrement tassé. La résine est introduite en suspension dans le tampon correspondant, de manière à obtenir après sédimentation homogène une hauteur fonction de la nature de l'échangeur utilisé. Dans toutes les colonnes d'une série, la hauteur choisie doit être rigoureusement res -

pectée. L'échangeur doit toujours être recouvert de liquide.

B) Chromatographie des solutions

a) Amberlite CG 50 . Les colonnes sont garnies sur 2,5 cm de hauteur d'Amberlite tamponnée à pH 6,1. Après passage des solutions à étudier, les colonnes sont lavées à l'aide de 5 ml d'eau bidistillée neutralisée à pH 6,1.

L'élution s'effectue à l'aide de 5 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N. Les éluats recueillis quantitativement sont amenés à pH 6,0 ($\pm$ 0,05) à l'aide de soude diluée. 20 ml de tampon phosphaté 0,03 M à pH 6,0 sont ajoutés. Les solutions sont prêtes pour la chromatographie sur Cellex P.

b) Cellex P, Les colonnes sont garnies sur 4 cm de hauteur de Cellex P tamponné à pH 6,0. Après passage de solutions préalablement purifiées par chromatographie sur Amberlite CG 50, les colonnes sont lavées avec 5 ml d'eau bidistillée neutralisée à pH 6,0 et éluées à l'aide de 5 ml de solution de chlorure de sodium 0,2 M. Les éluats sont recueillis quantitativement.

4. Développement de la fluorescence et calculs

Les éluats sont divisés en deux parties aliquotes de 2 ml chacune. D'autre part, des blancs réactifs et des étalons externes sont préparés. Les blancs réactifs sont constitués par 2 ml de solution de NaCl 0,2 M, les étalons externes par 2 ml de solution de NaCl 0,2 M, auxquels est ajoutée une quantité déterminée d'histamine en solution aqueuse à 1 µg/ml, fonction de la quantité d'histamine des étalons internes.

Le dosage est réalisé selon la technique de SHORE et coll. (147), légèrement modifiée (les volumes de tous les réactifs sont diminués de moitié). Chaque tube est additionné de 0,2 ml de soude 1N et de 0,05 ml de solution de OPT à 1 % (P/V) dans le méthanol. Quatre minutes exactement après l'addition de ce réactif, 0,1 ml d'acide chlorhydrique 3N est ajouté. Lors de l'addition de chacun des réactifs, les tubes sont agités à l'aide d'un agitateur électrique.

La fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre Jobin-Yvon, modèle Bearn, équipé d'une lampe Xénon-mercure. (Longueurs d'onde : excitation 365 nm, fluorescence 450 nm).

Calculs

BR étant la moyenne des blancs réactifs, BC la moyenne des blancs colonne, EE la moyenne des étalons externes, et EI la moyenne des étalons internes exprimés en unités arbitraires de fluorescence, le rendement est calculé par la formule :

$$\frac{5 \times B \times (EI-BC)}{2 \times A \times (EE-BR)} \times 100$$

dans laquelle A est la quantité d'histamine ajoutée aux étalons internes ; il doit toujours être supérieur à 75 %.

Les taux d'histamine en ng/g sont donnés par la formule :

$$\frac{A \times (T-BC)}{(EI-BC) \times P}$$

dans laquelle T représente les unités de fluorescence enregistrées pour un échantillon et P son poids (exprimé en grammes).

DISCUSSION

1. Déprotéinisation

Nous avons décrit l'emploi de deux déprotéinisants : l'éthanol (74 % V/V) et l'acide perchlorique (0,4 N) ; ces deux méthodes fournissent des résultats comparables. Le choix de l'une ou l'autre méthode est basé sur des critères de commodité opératoire.

Ainsi, dans le cas de la déprotéinisation des fractions histamine"libre" et "liée"il est préférable d'utiliser l'acide perchlorique : l'emploi de l'éthanol entraîne une trop grande dilution de l'échantillon.

Dans les autres cas, l'éthanol est utilisé d'une façon préférentielle : il fournit en général des rendements légèrement supérieurs. Ce phénomène peut être expliqué par une légère adsorption de l'histamine sur le précipité de perchlorate de potassium lors de l'élimination de l'excès de réactif défécant.

2. Purification

A) Etude de la sélectivité des différentes résines

- Amberlite CG50 : Des solutions pures d'histamine, de spermidine et d'histidine sont soumises à une chromatographie simple sur amberlite CG50. Les résultats consignés sur le tableau 1 montrent que cette résine n'est pas utilisable pour la séparation de l'histamine, de la spermidine et de l'histidine (Dosages fluorimétriques : pour l'histidine méthode d'AMBROSE et coll. (9) et pour la spermidine, méthode de ELLIOT et coll. (44)).

Tableau 1

SELECTIVITE DE L'AMBERLITE CG50

	Effluent	Lavage	Eluat
HISTAMINE (100 ng/col)	-	-	92,5 ± 2,2
SPERMIDINE (100 µg/col)	-	-	98,0 ± 0,8
HISTIDINE (25 µg/col)	12,5 ± 0,8	5,6 ± 0,2	5,9 ± 0,8

Les résultats exprimés en ng et µg sont la moyenne de 3 expériences ± Sm.

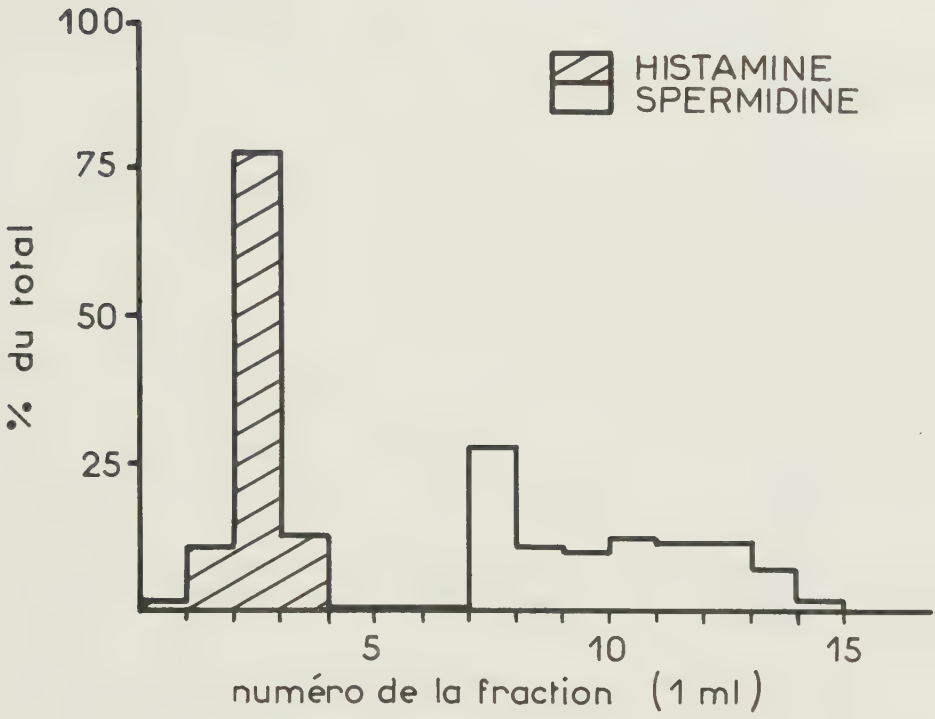
- Cellex P : Sur cette résine, l'histamine et la spermidine sont fixées. L'élution sélective de l'histamine est fonction, dans des limites très étroites, du volume de résine employée (91). Nous avons vérifié que l'emploi d'une colonne de résine de 6 mm de diamètre et 4 cm de hauteur nécessite 10 ml de solution éluante pour extraire la totalité de l'histamine fixée (100 ng).

De manière à réduire la quantité de solution éluante nous avons utilisé une colonne de 4 x 40 mm. Sur chaque colonne un mélange d'histamine (100 ng) et de spermidine (100 µ g) sont introduites dans 20 ml de solution tampon phosphate pH 6,0 (0,03 M).

Dans ces conditions, nous avons collecté la solution éluante (15 ml) par fractions de 1 ml et dosé l'histamine et la spermidine.

Figure 1

Sélectivité de la cellulose phosphorylée



Les résultats résumés dans la figure 1 montrent que la totalité de l'histamine est éluée par les 5 premiers ml, alors que la spermidine n'apparaît qu'à partir du 7ème millilitre.

Dans une deuxième série d'expériences, en utilisant des solutions pures d'histamine, de spermidine et d'histidine, nous avons d'une part vérifié que dans ces conditions l'histidine n'est pas retenue et passe en totalité dans les effluents et eaux de lavage, et d'autre part confirme les résultats précédents.

Le tableau 2 résume les essais réalisés.

Tableau 2
SELECTIVITE DE LA CELLEX P

	Effluents	Lavage	Eluat-1	Eluat-2	Eluat-3
ISTAMINE (100 ng/col)	-	-	92,9 ± 2,3	-	-
PERMIDINE (100 µg/col)	-	-	-	88,5 ± 2,4	16,6 ± 4,8
ISTIDINE (6 µg/col)	5,6 ± 0,3	0,28 ± 0,01	-	-	-
ISTIDINE (25 µg/col)	23,2 ± 0,3	1,03 ± 0,01	-	-	-

Les résultats exprimés en ng et µg sont la moyenne de 3 expériences ± Sm.

Tous ces résultats montrent que les volumes de résine et de solution éluante employés permettent de séparer l'histamine dans de bonnes conditions.

Nous rappellerons que la technique de préparation de la Cellex-P préalable à l'utilisation est primordiale ; contrairement à KREMZNER (89), nous n'effectuons pas les lavages préliminaires à l'acide chlorhydrique, au chlorure de sodium, au carbonate de sodium et à la soude. Nous n'effectuons que des lavages à l'eau bidistillée et avec les tampons. Avec la méthode décrite par KREMZNER (89), les rendements obtenus sont de l'ordre de 65 %, alors que nous enregistrons à l'aide de notre technique des rendements de l'ordre de 90-95 %.

B) Etude de la sélectivité des résines à l'aide d'extraits tissulaires

- extraits tissulaires éthanoliques :

Des parties aliquotes d'un même extrait éthanolique de cerveau de rat ont été soumises à trois purifications différentes :

- chromatographie simple sur Amberlite CG50
- chromatographie simple sur Cellex P
- deux chromatographies successives sur Amberlite CG50 suivie de Cellex P.

Les résultats sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3

Sélectivité des différents modes de purification

Amberlite CG50	Cellex P	Amberlite CG50 + Cellex P
244,34 ± 25,46	65,56 ± 4,48	45,00 ± 1,80
Les résultats exprimés en ng/g sont la moyenne de 3 expériences ± Sm.		

- Les taux d'histamine enregistrés par l'utilisation de l'Amberlite CG50 sont très largement supérieurs aux taux actuellement admis, du fait de la mauvaise sélectivité de cette résine (tableau 1).

- La chromatographie sur Cellex P est difficile : le faible pouvoir précipitant de l'éthanol fournit des extraits contenant des quantités assez importantes de protéines ; la vitesse d'écoulement se trouve largement ralentie et s'avère très irrégulière. Malgré ces inconvénients, cette purification est très supérieure à celle obtenue avec l'Amberlite CG50. Les résultats sont cependant élevés par rapport à ceux trouvés dans la littérature. Comme nous le verrons dans la suite, un déprotéinisant plus efficace est nécessaire dans ce dernier cas.

- L'utilisation successive des deux échangeurs semble satisfaisante, les résultats obtenus sont en accord avec les résultats les plus récemment publiés (107) (120).

- extraits tissulaires perchloriques

Un extrait tissulaire perchlorique a été soumis à une chromatographie simple sur Cellex P. Les résultats obtenus sont de :

$$40,1 \pm 4,1 \quad ng/g$$

Ce résultat n'est pas significativement différent de celui obtenu par la technique "éthanol-Amberlite CG50-Cellex P".

Cependant l'expérience montre que les résultats de la technique utilisant la déprotéinisation perchlorique et la chromatographie sur Cellex P sont toujours plus dispersés. En outre, il faut utiliser des extraits tissulaires plus dilués et laver la colonne à l'aide de quantités d'eau bidistillée beaucoup plus importantes (20 ml au lieu de 5 ml). Dans ces deux types d'expériences : "acide perchlorique-Cellex P" et "éthanol-

Amberlite CG50-Cellex P", les rendements sont comparables.

Enfin, les vérifications suivantes ont été réalisées sur les extraits tissulaires purifiés selon la méthode "éthanol-Amberlite CG50-Cellex P" :

1) Après la réaction de condensation à l'OPT, ils présentent les mêmes caractéristiques spectrales que celles d'une solution pure d'histamine dans les mêmes conditions.

2) Les éluats correspondant à 5 cerveaux de rat ont été réunis et concentrés à un volume de 200 µl ; 10 µl ont été chromatographiés sur couche mince de gel de silice F_{254} (Merck), suivant les techniques de AURES et coll. (12). Après traitement avec une solution acide d'OPT, une seule tache s'est révélée possédant les mêmes caractéristiques (Rf, couleur) qu'une solution pure d'histamine traitée parallèlement.

Conclusion

Les résultats précédents montrent clairement que la technique de purification proposée "éthanol-Amberlite CG50-Cellex-P" permet une excellente séparation de l'Histamine avec un rendement très satisfaisant.

Cette technique présente à notre avis d'autres avantages :

- Lorsqu'il s'agit de doser en même temps que l'histamine des substances à caractère fortement basique, celles-ci sont retenues sur la colonne d'amberlite, leur élution nécessite la mise en oeuvre d'une solution fortement alcaline (NaOH 1N). Une élution sélective est donc particulièrement commode.

Ainsi, l'imipramine ou la diphénhydramine peuvent être dosées parallèlement à l'histamine à partir d'un même échantillon tissulaire.

- Sur une partie aliquote de l'éluat chlorhydrique d'Amberlite, il est possible de doser la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine, en employant les techniques de fluorescence classiques.

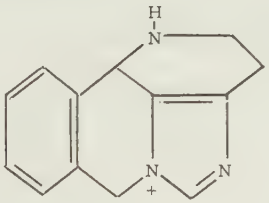
Dans ce cas, il faut employer une Amberlite CG50 plus fine (200 400 mesh), le rendement pour ces substances s'en trouve amélioré, celui de l'histamine restant inchangé.

3. Fluorescence et calculs

A) Réaction de condensation

SHORE et coll. ont montré que l'OPT se condense avec l'histamine en milieu fortement alcalin pour donner un composé présentant une inten-

se fluorescence en milieu très acide. La structure proposée pour ce dérivé est la suivante :



Cependant, cette structure n'a jamais été expérimentalement démontrée.

Selon KREMZNER (89), la présence d'halogènes dans le milieu réactionnel produit une inhibition de la fluorescence qui affecte plus celle de la spermidine que celle de l'histamine.

En outre, ELLIOT et MICHAELSON (44) ont montré que pour les concentrations inférieures à 0,2 M en Cl^-, cette diminution était négligeable pour l'histamine, alors que la spermidine voit son intensité de fluorescence très fortement inhibée (environ 3 fois).

Nous avons observé qu'en milieu fortement concentré (2M en NaCl ou 1N en NaOH), la fluorescence de l'histamine (25 ng) est diminuée de moitié par rapport à celle obtenue en milieu relativement dilué (0,2 M en NaCl ou 0,1 N en NaOH).

Pour la spermidine (5 µg), en milieu nitrique 0,2 N, la fluorescence est environ 10 fois plus intense qu'en présence de NaCl 0,2 M.

Cette sensibilité différente de l'histamine et de la spermidine aux ions Cl^- (115) est confirmée par le fait que le remplacement de l'acide chlorhydrique utilisé habituellement pour stabiliser la réaction par une quantité équivalente d'acide phosphorique 3,5 M n'entraîne aucune modification de la fluorescence de l'histamine, mais double celle de la spermidine. En conséquence, nous n'utilisons que l'acide chlorhydrique.

B) Spécificité

La spécificité du dosage fluorimétrique décrite par SHORE et coll. a été vérifiée en mesurant les intensités de fluorescence que donnent dans les conditions du dosage différentes substances. Les déviations enregistrées avec les substances suivantes sont négligeables : 3-méthylhistidine, N-acétyl histidine, 1-4-méthyl histamine, N-acétylhistamine, tryptophanne 5-hydroxytryptophanne, 5-hydroxytryptamine, acide imidazole acétique, acide 1-méthyl imidazole acétique, acide imidazole pyruvique, acide 2-4 diamino-butyrique et acide dihydrourocanique.

Tableau 4

Intensités relatives des fluorescences développées par différentes substances, avant et après purification.

Substances	Intensité de Fluorescence	
	avant purification	après purification
Histamine	100,0	81,0
Histidinol	26,0	17,0
Spermine	0,7	0,0
Spermidine	3,7	0,1
Histidine	15,7	0,0
Ester méthylique de l'Histidine	17,0	1,3
Arginine	2,0	0,0

Les fluorescences sont rapportées à celle de l'Histamine fixée arbitrairement à 100. Chaque substance a été utilisée à la dose de 200 rM.

Des déviations non négligeables ont été obtenues avec les substances suivantes : histidinol, spermine, spermidine, histidine, ester méthylique de l'histidine et arginine. Le tableau 4 indique les intensités de fluorescence de ces substances avant et après purification suivant notre méthode. Il a été nécessaire d'employer des concentrations élevées dans le but d'obtenir une fluorescence détectable pour de la spermine et l'arginine, mais il est remarquable qu'à cette concentration (200 nM), la linéarité ne soit plus respectée pour l'histamine. Parmi ces déviations, seul l'histidinol pourrait fausser cette mesure, mais selon les observations de Mc INTIRE et coll. (102), l'histidinol est absent des tissus des mammifères, il en est de même de l'agmatine (90). D'autre part, après condensation avec l'OPT, l'histidinol présente des caractèristiques spectrales différentes de celles que donne l'histamine dans les mêmes conditions (maximum de fluorescence à 490 et 450 nm respectivement).

C) Sensibilité et linéarité

La technique proposée permet de doser dans des conditions satisfaisantes 2,5 ng/ml (soit 5 ng dans la prise d'essai) d'histamine. La déviation enregistrée reste proportionnelle à la concentration d'histamine jusqu'à environ 50 ng/ml (soit 100 ng dans la prise d'essai).

MICHAELSON (114) a constaté que les caractéristiques chromatographiques de la Cellex-P se modifient avec le temps.

Il est donc nécessaire de contrôler à chaque expérience les caractéristiques d'absorption et d'élution, en préparant parallèlement aux solutions à doser, des blancs colonnes et des étalons internes.

Trois types de blancs peuvent à priori être utilisés : blanc colonne, blanc réactif et blanc interverti pour lequel l'addition de l'OPT est effectuée après celle de l'acide. Nous avons pu constater que :

1) Les blancs colonnes donnent une intensité de fluorescence environ deux fois plus forte que celle des blancs réactifs. La méthode de lavage de la Cellex-P ne modifie pas la valeur de ce rapport.

2) L'intensité de fluorescence des blancs réactifs est supérieure à celle des blancs intervertis. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le NaCl 0,2 M employé pour l'élution de la Cellex-P entraîne des substances qui réagissent avec l'OPT. Il en résulte que l'utilisation du blanc interverti lors des dosages entraîne nécessairement une erreur par excès.

C'est pourquoi, dans nos calculs, nous n'utiliserons que les blancs réactifs et les blancs colonnes. Les étalons internes seront calculés de manière à contenir une quantité d'histamine aussi proche que possible de celle contenue dans les extraits tissulaires.

2ème PARTIE

CHAPITRE I : L'histamine dans le système nerveux central chez différentes espèces.

CHAPITRE II : Histamine "libre" et "liée".

CHAPITRE III : Variations de l'histamine en fonction de l'âge chez le rat.

CHAPITRE I

L'HISTAMINE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL CHEZ DIFFERENTES ESPECES

La détermination des concentrations d'histamine est effectuée sur le cerveau entier et les différentes régions cérébrales pour des espèces couramment utilisées dans la recherche pharmacologique.

1. Histamine dans le cerveau entier

L'histamine a été dosée dans les cerveaux entiers chez la souris, le rat, le cobaye, le lapin, le chat et le chien. Les caractéristiques des animaux utilisés sont les suivantes :

a) Souris. Swiss (Charles River) adultes, mâles de poids corporel compris entre 18 et 22 grammes.

b) Souris noires. Souche DBA Jackson Laboratories. Poids corporel compris entre 16 et 20 grammes.

c) Rats Wistar (Charles River), adultes, mâles. Poids corporel compris entre 180-200 grammes (âge approximatif 10 semaines).

d) Rats Long Evans . Rats mâles, poids corporel compris entre 70 et 80 g, âgés de 4 semaines.

e) Cobayes tricolores (Ardenay). Poids corporel compris entre 180 et 200 g. Agés approximativement de 6 semaines.

f) Lapins blancs de Nouvelle-Zélande, mâles, poids corporel compris entre 5 et 6 kg. Age approximatif 4 ans.

g) Lapins fauves de Bourgogne, mâles, poids corporel compris entre 2,4 et 2,6 kg. Age approximatif 6 mois.

h) Chats mâles de poids corporel compris entre 1,8 et 2,3 kg.

i) Chiens femelles, poids corporel compris entre 8 et 10 kg.

Les résultats obtenus, ainsi que les poids cérébraux sont consignés sur le tableau 5.

Tableau 5

L'histamine dans le cerveau entier chez différentes espèces

Espèce	Taux moyen d'histamine ng/g ± Sm	Poids moyen g ± Sm
Souris Swiss	47,9 ± 3,8 (20)	0,454 ± 0,003
Souris noire DBA	43,4 ± 2,8 (24)	0,411 ± 0,005
Rat Wistar	41,5 ± 1,4 (40)	1,867 ± 0,010
Rat Long Evans	44,7 ± 2,8 (15)	1,396 ± 0,019
Cobaye	59,1 ± 1,6 (14)	2,947 ± 0,030
Lapin blanc (Nouvelle-Zélande)	49,1 ± 4,4 (5)	10,114 ± 0,405
Lapin fauve (de Bourgogne)	112,7 ± 4,7 (12)	9,067 ± 0,111
Chat	134,7 ± 6,0 (4)	24,251 ± 0,435
Chien	88,1 ± 13,9 (5)	63,577 ± 1,652

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'animaux.

Chez les espèces étudiées, les concentrations en histamine sont plus faibles que celles des autres amines biogènes ; les différentes concentrations sont relativement proches d'une espèce à l'autre. Il est à remarquer que des voies métaboliques différentes suivant les espèces ont été décrites (138).

Les concentrations en histamine trouvées par d'autres auteurs dans les cerveaux de souris (11), de rat (23) (54) (33) (107) (11) (129), de cobaye (11) (55) et de lapin (11) (33) sont dans la plupart des cas du même ordre de grandeur que celles que nous avons enregistrées. Mais les résultats publiés portent souvent sur des parties du cerveau plus ou moins bien définies. La comparaison de ces résultats s'avère de ce fait difficile. En outre, les caractéristiques des animaux ne sont généralement pas précisées.

La mesure de l'histamine cérébrale a aussi été effectuée chez les souris noires (DBA) Jackson Laboratoires mutants homozygotes "Quaking mouse" QK QK présentant des troubles épileptiques (148) (149). La concentration en histamine : 45,8 ± 4,5 ng/g n'est pas significativement différente de celle des témoins 43,4 ± 2,8 ng/g (tableau n° 4).

2. Distribution régionale de l'histamine chez les différentes espèces

Dans cette série d'expérimentations, nous avons utilisé les mêmes animaux que précédemment. Afin d'obtenir une sensibilité satisfaisante, il a été nécessaire chez les espèces dont le poids cérébral est inférieur à 3 grammes de regrouper les régions homologues provenant de divers animaux.

Rat : le cortex, l'hypothalamus et le thalamus sont groupés par deux ; le bulbe, le cerveau moyen, le cervelet, les corps striés et l'hippocampe sont groupés par six.

Cobaye : Le tronc cérébral est groupé par deux ; le cervelet, les corps striés et l'hippocampe par trois.

Tableau 6

Distribution régionale de l'histamine chez le rat Wistar
(40 animaux)

Région cérébrale	Taux moyen d'histamine (± Sm) en ng/g tissu frais	Poids moyen (± Sm) en mg
Bulbe	23,8 ± 1,3	196,1 ± 1,3
Cerveau moyen	40,5 ± 1,9	118,4 ± 2,9
Cervelet	18,9 ± 1,5	255,5 ± 3,1
Corps striés	56,0 ± 2,1	114,6 ± 2,3
Cortex	39,0 ± 0,9	917,3 ± 11,8
Hippocampe	39,8 ± 1,9	110,1 ± 4,4
Hypothalamus	240,0 ± 13,0	69,3 ± 2,1
Thalamus	157,5 ± 6,7	90,2 ± 1,4

Tableau 7

Distribution régionale de l'histamine chez le cobaye
(24 animaux)

Région cérébrale	Taux moyen d'histamine (± Sm) en ng/g tissu frais	Poids moyen (± Sm) en mg
Cervelet	27,7 ± 2,2	366,8 ± 6,3
Corps striés	57,1 ± 2,7	126,5 ± 5,1
Cortex	56,5 ± 2,8	1437,5 ± 23,5
Hippocampe	56,4 ± 3,8	223,0 ± 5,0
Hypothalamus	233,9 ± 16,7	101,4 ± 2,6
Thalamus	86,1 ± 7,6	150,7 ± 6,5
Tronc cérébral	47,5 ± 3,0	543,3 ± 9,2

Tableau 8

Distribution régionale de l'histamine chez le lapin blanc de Nouvelle-Zélande
(12 animaux)

Région cérébrale	Taux moyen d'histamine (± Sm) en ng/g tissu frais	Poids moyen (± Sm) en
Cervelet	52,8 ± 2,5	1,381 ± 0,070
Corps striés	74,4 ± 8,0	0,293 ± 0,029
Cortex	36,3 ± 2,2	4,769 ± 0,360
Hippocampe	41,3 ± 3,4	0,708 ± 0,091
Hypothalamus	268,3 ± 29,3	0,275 ± 0,066
Thalamus	49,1 ± 2,6	0,325 ± 0,048
Tronc cérébral	45,1 ± 2,5	2,363 ± 0,141

Tableau 9

Distribution régionale de l'histamine chez le lapin fauve de Bourgogne
(12 animaux)

Région cérébrale	Taux moyen d'histamine (±Sm) en ng/g tissu frais	Poids moyen (±Sm) en g
Cervelet	76,7 ± 4,4	1,143 ± 0,021
Corps striés	147,9 ± 7,5	0,315 ± 0,016
Cortex	88,6 ± 4,0	4,237 ± 0,086
Hippocampe	128,7 ± 6,0	0,757 ± 0,030
Hypothalamus	366,3 ± 26,0	0,258 ± 0,013
Thalamus	195,1 ± 14,3	0,319 ± 0,030
Tronc cérébral	123,7 ± 4,3	2,051 ± 0,047

Tableau 10

Distribution régionale de l'histamine cérébrale chez le chat
(5 animaux)

Région cérébrale	Taux moyen d'histamine (±Sm) en ng/g tissu frais	Poids moyen (± Sm) en g
Cervelet	78,3 ± 6,1	3,003 ± 0,087
Corps striés	167,3 ± 43,1	1,352 ± 0,089
Cortex	124,8 ± 5,8	15,396 ± 0,369
Hippocampe	227,5 ± 26,8	0,747 ± 0,043
Hypothalamus	378,8 ± 29,5	0,499 ± 0,106
Thalamus	315,0 ± 31,4	0,718 ± 0,080
Tronc cérébral	130,5 ± 12,3	2,536 ± 0,089

Tableau 11

Distribution régionale de l'histamine cérébrale chez le chien
(5 animaux)

Région cérébrale	Taux moyen d'histamine (±Sm) en ng/g tissu frais	Poids moyen (±Sm) en g
Cervelet	77,8 ± 16,6	5,744 ± 0,447
Corps striés	116,0 ± 20,1	1,952 ± 0,174
Cortex	74,0 ± 11,5	48,350 ± 2,100
Hippocampe	161,1 ± 36,6	1,819 ± 0,184
Hypothalamus	494,8 ± 80,1	0,963 ± 0,035
Thalamus	168,1 ± 30,2	2,434 ± 0,174
Tronc cérébral	97,2 ± 18,5	6,032 ± 0,108

Une partie aliquote des extraits tissulaires a été utilisée dans les cas suivants :

- cortex de lapin
- toutes les régions du cerveau du chien et du chat.

Les résultats enregistrés dans les tableaux n° 6 à 11 montrent clairement que, pour toutes les espèces étudiées, la répartition régionale de l'histamine n'est pas homogène. Les concentrations les plus importantes se retrouvent toujours dans l'hypothalamus. Le thalamus présente lui aussi une concentration importante bien que plus faible (à l'exception du lapin blanc de Nouvelle-Zélande). Cette richesse remarquable de l'hypothalamus rapportée par PARRY et coll. (122) chez l'homme et par I.A. MICHAELSON (113) chez le singe semble générale chez les mammifères (3) (170) (129).

Les corps striés et l'hippocampe présentent des taux qui varient d'une espèce à l'autre.

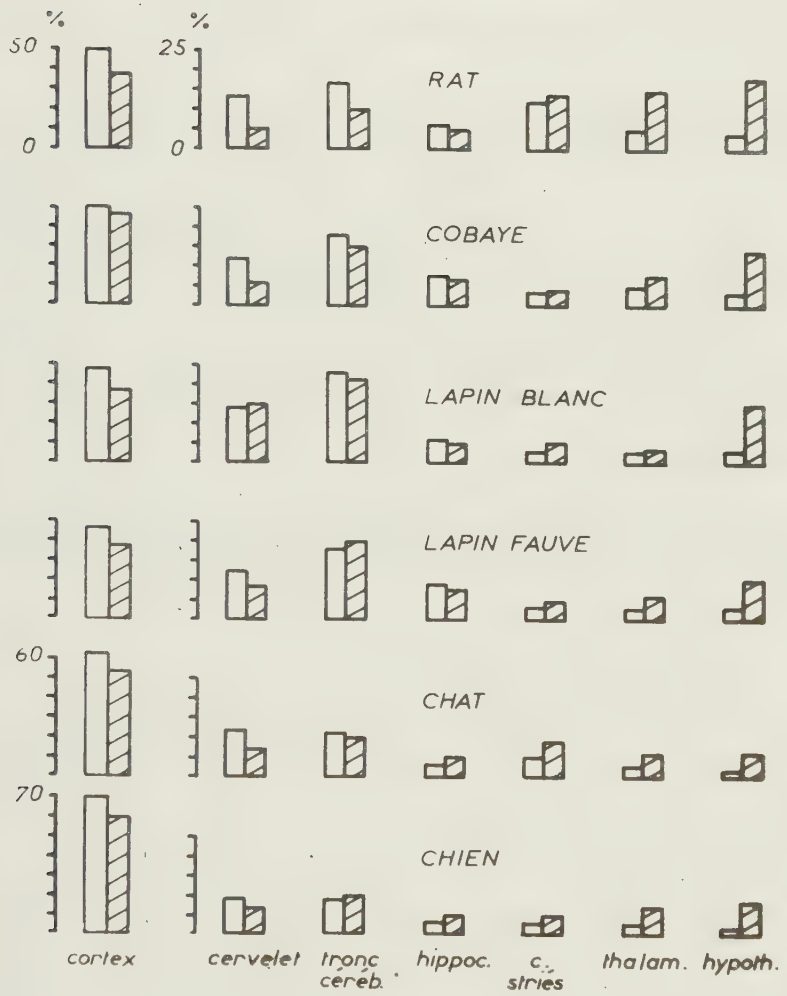
Le cervelet, le cortex et le tronc cérébral sont des régions pauvres en histamine.

Les différences déjà observées entre les deux races de lapins pour le cerveau entier (tableau n° 5) se retrouvent dans le cas des régions cérébrales. La différence de races, ainsi que la différence d'âge (comme nous le verrons plus tard) pourraient expliquer ce phénomène. KREMZNER et coll. (90) constatent également une différence entre les taux pour le cerveau entier chez le lapin blanc de Nouvelle-Zélande et chez le lapin Dutch.

Figure 2 :

Répartition régionale de l'histamine chez les différentes espèces

Colonnes blanches : poids en % du cerveau
Colonnes hachurées : histamine en % de l'histamine totale



La figure n° 2 rassemble tous les résultats figurant dans les tableaux précédents (6 à 11). La hauteur des colonnes est proportionnelle :

- pour les colonnes blanches, au pourcentage de poids de chaque région par rapport au poids total du cerveau

- pour les colonnes hachurées, au pourcentage de la quantité d'histamine présente dans chaque région par rapport à la quantité totale d'histamine du cerveau entier (colonnes hachurées).

Ce mode de représentation permet :

1. de comparer les différentes structures d'une même espèce (lecture horizontale) ;

2. de comparer une même structure chez les différentes espèces (lecture verticale).

De plus, pour une structure donnée chez un animal, la comparaison entre la hauteur de la colonne blanche (poids) et celle de la colonne hachurée (histamine), donne directement une idée précise de la richesse en histamine de la structure considérée.

Chez toutes les espèces, le cortex, le cervelet et le tronc, sont des régions relativement pauvres : la figure montre que la hauteur des colonnes hachurées représentant le pourcentage d'histamine, est plus petite ou du même ordre de grandeur que les colonnes blanches (représentant le pourcentage de poids).

Inversement, les corps striés, le thalamus et particulièrement l'hypothalamus sont des régions riches. L'hippocampe semble contenir, chez les rongeurs, relativement peu d'histamine.

CHAPITRE II

HISTAMINE "LIBRE" ET "LIEE"

Dorénavant, nous utiliserons le rat dans nos expériences à cause de sa relative insensibilité aux actions pharmacologiques périphériques de l'histamine.

Dans ce chapitre, nous avons étudié chez le rat la distribution de l'histamine dans les deux fractions dénommées "libre" et "liée"; cette étude porte sur le cerveau entier aussi bien que sur les différentes régions cérébrales.

1. Cerveau entier

Après homogénéisation des cerveaux entiers, le fractionnement s'effectue par ultracentrifugation à 100.000 g ; l'histamine dosée dans les éléments figurés (culot), sera appelée "histamine liée" et l'histamine dosée dans le liquide surnageant (privé d'éléments figurés) sera appelée "histamine libre".

Les résultats concernant 20 rats mâles (Charles River) de 180 $\pm$ 20 g de poids corporel âgés de 10 semaines, sont consignés dans le tableau n° 12. Deux modes d'expression sont utilisés : concentration (en ng/g de tissu frais) et pourcentage d'histamine dans chaque fraction par rapport à l'histamine totale.

Tableau 12

Fraction	Histamine en ng/g ± Sm (Nb d'expériences)	%
Histamine liée	31,2 ± 0,7 (10)	69,6
Histamine libre	13,6 ± 0,6 (10)	30,4
Histamine totale	44,8 ± 1,3	100

L'histamine retrouvée sous forme liée représente 70 % de l'histamine totale ; une répartition identique de la sérotonine a été rapportée par SCHANBERG et coll. (136). Les catécholamines se trouveraient sous forme liée en plus faible proportion : dopamine 44 % et noradrénaline 54 % (59).

Malgré cette différence quantitative, par l'ultracentrifugation différentielle, il a été montré que l'histamine (154) (79) et les autres amines biogènes (36) (137) (37) (106) (38) se trouvent d'une façon préférentielle dans les synaptosomes.

2. Différentes régions

La même expérience a été réalisée sur les différentes régions cérébrales ; étant donné la faible concentration en histamine libre, il a été nécessaire d'effectuer le groupage d'un nombre de régions homologues double de celui proposé dans les expériences précédentes.

Dans le tableau n° 13, sont enregistrés pour chaque région :

a) Les concentrations d'histamine libre et liée en ng/g.

b) Le pourcentage d'histamine dans chaque fraction par rapport à l'histamine totale.

c) Le rapport entre l'histamine liée et l'histamine libre (H. liée/H. libre).

Les résultats obtenus montrent que, dans toutes les structures, les taux d'histamine liée sont toujours largement supérieurs aux taux d'histamine libre.

L'observation du rapport d'histamine liée/histamine libre permet de séparer deux groupes de structures :

Tableau 13

Répartition régionale de l'histamine libre et liée

Région	Histamine (ng/g ± Sm)		Rapport (a)/(b)	Histamine % du total	
	Liée (a)	Libre (b)		Liée	Libre
Cervelet	23,7 ± 3,0	13,2 ± 0,1	1,7	64,1	35,9
Hippocampe	22,6 ± 3,5	15,9 ± 4,4	1,4	58,7	41,3
Cortex	25,4 ± 1,1	13,9 ± 1,5	1,8	64,6	35,4
Tronc	25,8 ± 0,9	15,0 ± 2,4	1,7	63,2	36,8
C. striés	54,7 ± 1,4	20,1 ± 8,0	2,7	73,8	26,2
Thalamus	128,3 ± 16,6	46,3 ± 10,5	2,8	73,5	26,5
Hypothalamus	200,3 ± 12,3	56,8 ± 9,1	3,5	77,9	22,1

- Le cervelet, l'hippocampe, le cortex et le tronc pour lesquels i'histamine liée représente environ deux fois l'histamine libre.

- Les corps striés, le thalamus et l'hypothalamus pour lesquels l'histamine liée est trois fois plus importante que l'histamine libre.

Dans les régions les plus riches en histamine, la fraction liée représente une partie plus importante de l'histamine totale que dans les régions à faible concentration en histamine.

Ces constatations sont à rapprocher du fait que les régions à plus forte concentration en histamine sont en même temps les plus riches en synapses.

D'autre part, KATAOKA et de ROBERTIS (79), dans une étude détaillée de la répartition subcellulaire de l'histamine dans le cortex de rat, montrent à l'aide de la microscopie électronique que les fractions subcellulaires les plus riches en terminaisons nerveuses sont également les plus riches en histamine. Ce phénomène est identique pour les autres amines biogènes (79).

Il est alors permis de penser que l'augmentation de la proportion d'histamine liée dans l'hypothalamus, le thalamus et les corps striés serait une conséquence de la présence dans ces régions d'un plus grand nombre de terminaisons nerveuses.

De même, il serait possible de penser que dans ces structures, l'histamine a des chances de jouer un rôle au niveau des synapses.

CHAPITRE III

VARIATIONS DE L'HISTAMINE CEREBRALE EN FONCTION DE L'AGE CHEZ LE RAT

Dans ce chapitre, les variations des taux d'histamine en fonction de l'âge sont étudiées dans le cerveau entier et dans les différentes régions cérébrales.

1. Cerveau entier

Des rats (Charles River) d'âge compris entre la naissance (moins de trois heures) et douze semaines ont été utilisés.

Pour chacun des âges étudiés, sont consignés dans le tableau n° 14 :

- les poids corporels en grammes
- les poids cérébraux en milligrammes
- la concentration en histamine en nanogrammes par gramme
- la quantité totale d'histamine par cerveau en nanogrammes.

En bas du tableau est noté le degré de signification des variations.

D'autre part, sur la figure 3, les différents paramètres sont exprimés en fonction de l'âge.

- Le poids cérébral augmente très rapidement jusqu'à l'âge de deux semaines ; le taux de croissance est ensuite nettement plus faible.

- La concentration en histamine (ng/g) augmente jusqu'à l'âge d'une semaine, elle décroît ensuite rapidement jusqu'à quatre semaines et reste constante à partir de la sixième semaine.

- La quantité totale d'histamine présente par cerveau, passe aussi par un maximum : les courbes représentant ces deux derniers phénomènes ont un aspect comparable. Ceci indique que les variations de concentration ne sont pas dues aux variations du poids cérébral.

Tableau 14

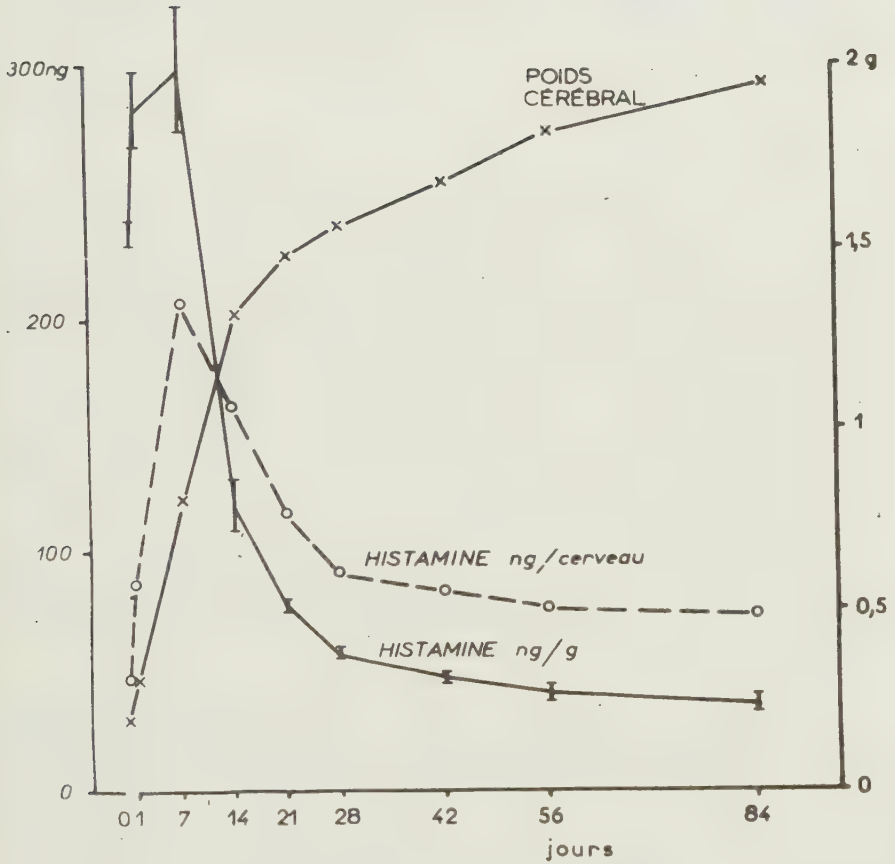
Variations de l'histamine cérébrale en fonction de l'âge

Age Jours	Poids corporel g ± Sm (Nombre d'animaux)	Poids cérébral mg ± Sm	Histamine ng/g ± Sm	Histamine par cerveau en ng
Nais.	5,4 ± 0,2 (5)	212,4 ± 2,6	232,9 ± 4,9^{d,x}	49,37
1	8,3 ± 0,2 (10)	284,4 ± 15,1	284,4 ± 15,1^{a,x}	86,46
7	15,0 ± 0,4 (9)	679,4 ± 7,8	301,2 ± 26,6^{x}	204,63
14	33,5 ± 0,9 (11)	1 330,2 ± 13,7	119,4 ± 10,8^{c,x}	158,83
21	55,6 ± 2,6 (6)	1 479,0 ± 14,2	77,6 ± 2,3^{d,x}	114,77
28	80,2 ± 0,8 (22)	1 558,2 ± 15,6	58,3 ± 2,0^{b,x}	90,84
42	145,0 ± 4,0 (10)	1 700,0 ± 20,0	49,3 ± 2,0^{y}	83,81
56	213,0 ± 3,0 (6)	1 853,7 ± 21,7	40,9 ± 3,1	75,82
84	294,0 ± 7,0 (6)	1 979,0 ± 2,1	37,7 ± 3,6	73,32

Variations significatives : par rapport à l'âge suivant : a($p < 0,001$), b($p < 0,01$), c($p < 0,02$) et d($p < 0,05$)
par rapport à 84 jours (12 semaines) : x ($p < 0,001$) et y($p < 0,01$)

Figure 3

Variations du poids et de l'histamine cérébrale en fonction de l'âge



L'examen de la figure n° 3 permet de distinguer deux phases successives :

- Une première phase où l'augmentation rapide du poids cérébral est parallèle à l'augmentation de l'histamine totale : jusqu'à une semaine, il existe une corrélation entre ces deux paramètres ($r = 0,9989$ significatif à $P < 0,02$ pour un test F de linéarité significatif à $P < 0,05$).

- Une deuxième phase où l'augmentation du poids cérébral est plus lente et où l'histamine totale décroît. Entre deux semaines et douze semaines, il existe une corrélation entre le poids et l'histamine totale ($r = 0,888$ significatif à $P < 0,02$, pour un test F de linéarité significatif à $P > 0,05$. Ces deux variables ont tendance à se stabiliser.

Discussion

a) Origine de l'histamine chez le rat jeune

Il est généralement admis que les tissus nerveux centraux du rat et d'autres mammifères sont capables de former de l'histamine à partir de l'histidine (65) (116) (168) (169) (127). Cependant, il est possible de discuter l'origine exogène ou endogène des fortes concentrations de cette amine dans le cerveau du rat jeune (74) (157) (120).

Les arguments suivants seraient en faveur d'une origine exogène :

- Suivant KAHLSON et coll. (74) et PEARCE et coll. (120), le tissu nerveux est incapable de décarboxyler l'histidine in vitro (absence d'activité "histidine décarboxylase").

- D'importantes concentrations d'histamine dans le foie et le poumon pendant les jours immédiatement avant et après la naissance (74) (61) pourraient franchir la barrière hématoméningée qui n'est pas encore développée (162).

Cependant, l'étude détaillée de ces faits, ainsi que d'autres qui seront mentionnés dans la suite, montrent que l'hypothèse de l'origine endogène de l'histamine au cours du développement est la plus vraisemblable. Cette hypothèse serait en accord avec les faits suivants :

- REILLY et SCHAYER (127) démontrent que la destruction de l'histamine dans le Système Nerveux Central est très importante : une heure après l'administration intracérébrale de ^{14}C-L-Histidine, les taux de ^{14}C-histamine trouvés diminuent très rapidement. Ce fait met en évidence que la plupart des expériences "in vivo" et "in vitro" mesurant l'"activité histidine décarboxylase" du tissu nerveux sont discutables (167) (95), car elles font intervenir des temps d'action trop prolongés (167) (74).

- La quantité totale d'histamine dans le cerveau de rat du 17ème jour de gestation à la naissance est constante, bien que sa concentration diminue (120). Pendant ce même intervalle de temps, il est observé une augmentation très importante de la concentration d'histamine ainsi que de l'activité histidine décarboxylase (74) (61) dans le foie, les poumons et le "foetus total".

- La quantité totale et la concentration d'histamine dans le cerveau augmentent durant la 1ère semaine après la naissance. En revanche, la concentration en histamine dans le foie, le poumon, ainsi que l'"animal entier" diminue très fortement pendant cette même période (74) (61).

- Approximativement, en même temps que l'histamine, la vitamine B_6 (18) (Cofacteur de l'histidine décarboxylase (118) (139)) et l'histidine (travaux en cours dans notre laboratoire) atteignent un taux maximum dans le cerveau : les taux de ces trois substances diminuent ensuite parallèlement.

- Des résultats partiels d'expériences en cours dans notre laboratoire semblent indiquer une augmentation de l'activité histidine décarboxylase entre le premier et le 6ème jour après la naissance.

La plupart de ces faits mettent en évidence que les variations de l'histamine au niveau du cerveau sont différentes de celles des autres organes. L'origine exogène de l'histamine cérébrale, si elle existe, ne semble pas pouvoir expliquer les phénomènes observés.

Il est possible de conclure que les hautes concentrations en histamine dans le cerveau ont pour origine principale une synthèse active de cette amine au niveau du tissu nerveux.

b) Rôle possible de l'histamine cérébrale pendant le développement

Nos expériences montrent une augmentation de l'histamine dans le Système Nerveux Central du rat pendant la première semaine.

Il nous semble légitime de rapprocher ce fait des importants changements qui ont lieu, dans le cerveau, pendant cette même période.

A la naissance, le développement cérébral du rat est très incomplet : la part la plus importante de ce développement a lieu postérieurement à la naissance (21).

Au niveau du cerveau, quatre phases bien différenciées ont été mises en évidence (100).

Phase I. Elle correspond à la vie foetale (100) (21). Au cours de cette phase, il apparaît une active reproduction cellulaire : 97 % des cellules définitives sont formées, bien qu'à la naissance le poids du

cerveau ne soit que de 15 % de celui de l'adulte (100) (21).

Phase II. Elle correspond aux dix premiers jours après la naissance (100) (21) :

- le poids du cerveau quadruple
- les axones et dendrites se développent (21) (43)
- des concentrations importantes en substances hydrosolubles apparaissent, en particulier des protéines (100) (49)
- la teneur en eau passe par un maximum (63) (100)
- la vascularisation est faible (26) (27) (28) (29) (30) (31)
- l'hippocampe, le cervelet et le bulbe olfatif présentent de nombreux micro-neurones en mitoses (6) (7) (8).

Phase III. Elle est comprise entre le 10ème et le 20ème jour après la naissance (100) (21) :

- la vitesse de croissance diminue, le poids du cerveau est à peine doublé
- la vascularisation augmente fortement (26) (30) (21)
- la myélinisation commence (métabolisme lipidique intense) (100) (156).

Phase IV. Elle débute au 20ème jour après la naissance et s'étend jusqu'à l'âge adulte (100) (21):

- la myélinisation se termine (100)
- les différents processus biochimiques se stabilisent (100).

Pendant la première phase, l'histamine totale reste constante et sa concentration diminue (120). Ceci permettrait de penser que l'histamine ne serait pas en rapport avec les phénomènes propres à la prolifération cellulaire caractéristique prédominante de la Phase I. C'est au cours de la deuxième phase, caractérisée par la rapide croissance cellulaire (poids quadruplé), que l'histamine atteint ses taux les plus élevés.

Il a été constaté par de nombreux auteurs, que les quantités d'histamine ainsi que les activités des enzymes en rapport avec la synthèse de cette amine, se trouvent augmentées dans tous les processus accompagnant un développement rapide. Tel est le cas de la régénération hépatique (75), des processus cancéreux (118) (143) (66) ou du développement foetal (70) (71) (72) (73) (74) (99) (19) (151) (105).

En accord avec ces données, il serait permis de penser que les importantes concentrations en histamine pendant la phase II pourraient n'être qu'une manifestation particulière d'un phénomène plus général, non spécifique du Système Nerveux Central.

Si on tient compte de l'activité pharmacologique de l'histamine sur la perméabilité capillaire (128) (93) (104) (117), les taux élevés de cette amine pendant la phase II pourraient être en rapport avec :

- l'augmentation du degré d'hydratation
- les variations des concentrations des ions Cl^- et Na^+ (63) (100)
- l'augmentation des protéines (particulièrement des protéines hydro-solubles)
- l'absence de barrière hématoméningée (162) (174)

Cependant, il est à remarquer que la vascularisation très faible, ne se développe pratiquement pas pendant cette période : elle est environ 5 fois moins importante qu'au 20ème jour (21).

L'histamine faciliterait le franchissement de la paroi des capillaires déjà formés par les acides aminés (47) (100) (17) et par d'autres substances.

Ceux-ci diffuseraient alors dans l'eau qui occupe les grands espaces extra-cellulaires caractéristiques de cette période de la vie (21). Ainsi, les taux élevés d'histamine pourraient "compenser" cette vascularisation peu importante et faciliter l'apport de substances nécessaires au développement du tissu cérébral.

Cette interprétation est en accord :

- d'une part, avec l'hypothèse proposée par SCHAYER (140) (141) (142) selon laquelle l'histamine serait régulateur de la circulation capillaire,

- d'autre part, avec les résultats expérimentaux de KELSALL et coll. (81), GROMAKOVSKAYA M.M. (57) et DONIER F.R. (42) qui constatent la modification de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique par l'action de l'histamine.

Pendant la phase III, le degré d'hydratation et la concentration ionique (Cl^- et Na^+ en particulier) (63) (100) diminuent. Il en est de même des espaces extracellulaires (21). A ce moment-là débute la myélinisation (100), qui s'accompagne d'une importante vascularisation des tissus (21). La quantité totale et la concentration d'histamine diminuent

Pendant la phase IV, on assiste aux mêmes phénomènes que pendant la phase précédente, mais leur intensité va en diminuant (100). Parallèlement, la concentration en histamine se stabilise.

Cette interprétation n'exclut pas que l'histamine peut aussi avoir les fonctions que divers auteurs lui ont attribué dans le Système Nerveux Central (31) (45) (116) (123).

Il faut noter que les variations de l'histamine pendant le dévelop-

pement sont très différentes de celles observées pour d'autres amines biogènes dont les taux augmentent progressivement sans passer par un maximum (78) (125) (13).

c) Catabolisme de l'histamine

Les hautes concentrations en histamine trouvées pendant le développement pourraient nous conduire à penser que le système enzymatique inactivateur de l'histamine possède à ce stade une activité moins importante que chez l'adulte.

Il est connu que l'histaminase (DAO) hépatique n'est pas active pendant la vie foetale (40). Nous ignorons s'il en est de même au niveau du cerveau et comment cette activité varie au cours du développement. Inversement, la MAO est active dès la naissance (13). L'activité de l'imidazoleméthyltransférase n'est pas connue pour cette période de la vie. Il est alors difficile d'expliquer les taux élevés d'histamine par la seule augmentation de l'activité de l'histidine décarboxylase. Parallèlement, il est nécessaire que les activités des enzymes du catabolisme soient moins intenses que chez l'adulte.

Dans ces conditions, une immaturité de ce système enzymatique ou le défaut d'activation d'un système déjà fonctionnel peut être envisagé.

2. Différentes régions

L'étude de la distribution régionale de l'histamine a été effectuée sur le cerveau de rats âgés d'une, deux et quatre semaines (24 animaux par lot). Une semaine est l'âge limite en-dessous duquel la dissection des différentes régions ne peut être effectuée sans que leur dimension et leur faible différenciation n'entraînent un trop grand risque d'erreur.

Les concentrations en histamine pour chacune des régions aux différents âges étudiés sont résumés dans le tableau n° 15.

Les concentrations régionales en histamine du rat âgé de 8 semaines sont consignées dans le tableau n° 6.

L'observation des résultats permet de constater les faits suivants :

1. la concentration en histamine reste toujours constante pour l'hypothalamus,

2. les concentrations en histamine diminuent en fonction de l'âge pour les autres régions. Cette diminution ne s'effectue pas de la même façon pour toutes les régions.

Tableau 15

Distribution régionale de l'histamine en fonction de l'âge

HISTAMINE en ng/g de tissu frais ± Sm (24 animaux par lot)			
Région	1 semaine	2 semaines	4 semaines
Bulbe	$52,0 \pm 1,3^{a,x}$	$38,7 \pm 5,3^{z}$	$29,1 \pm 1,9$
Cerveau moyen	$147,5 \pm 9,4^{a,x}$	$51,0 \pm 5,7^{z}$	$54,6 \pm 2,2^{y}$
Cervelet	$79,2 \pm 4,8^{a,x}$	$11,4 \pm 0,6^{b}$	$21,8 \pm 1,9$
Corps striés	$115,7 \pm 4,8^{b,x}$	$76,9 \pm 12,7$	$85,4 \pm 5,7^{y}$
Cortex	$334,5 \pm 6,4^{a,x}$	$111,5 \pm 7,7^{a,x}$	$43,2 \pm 1,8$
Hippocampe	$553,2 \pm 4,2^{a,x}$	$104,0 \pm 16,1^{d,x}$	$63,4 \pm 3,4^{x}$
Hypothalamus	$265,1 \pm 7,5$	$236,6 \pm 12,5$	$262,2 \pm 11,4$
Thalamus	$840,7 \pm 20,1^{a,x}$	$268,7 \pm 22,6^{b,y}$	$186,6 \pm 9,5^{z}$

Variations significatives : par rapport à 4 semaines : a ($p < 0,001$), b ($p < 0,01$), c ($p < 0,02$ et d ($p < 0,05$)
par rapport à l'adulte : x ($p < 0,001$, y ($p < 0,01$) et z ($p < 0,05$)

Dans un but de commodité dans la comparaison des résultats, nous avons représenté sur la figure 4 le poids en mg (colonnes blanches) et la quantité d'histamine en ng (colonnes hachurées pour chaque région d'une part et pour le cerveau entier d'autre part.

Ce mode de représentation permet un rapprochement immédiat des variations de poids et de celles de l'histamine.

- Les variations pour le cerveau entier sont la traduction des variations pour le cortex : ce fait peut être expliqué par la grande masse que représente le cortex par rapport au cerveau entier (50 %).

- Les différences entre les résultats trouvés à quatre et huit semaines sont négligeables. En revanche, les résultats pour la 1ère, la 2ème et la 4ème semaine, montrent des différences remarquables.

- Les variations entre une, deux et quatre semaines sont très différentes d'une région à l'autre.

Cortex et hippocampe. Ils évoluent en fonction de l'âge dans le même sens que le cerveau entier : diminution de la quantité d'histamine et augmentation du poids. Les variations sont plus importantes entre la 1ère et la 2ème semaine, qu'entre la 2ème et la 4ème.

Cervelet et bulbe. Dans ces régions, l'histamine reste constante ou augmente légèrement. L'augmentation du poids est très importante, particulièrement pour le cervelet. Cette région est celle qui présente la croissance la plus grande.

Thalamus et cerveau moyen. Dans ces deux régions mésencéphaliques, on constate entre une et deux semaines une diminution importante de l'histamine et une augmentation de poids. Ensuite, les variations restent pratiquement négligeables.

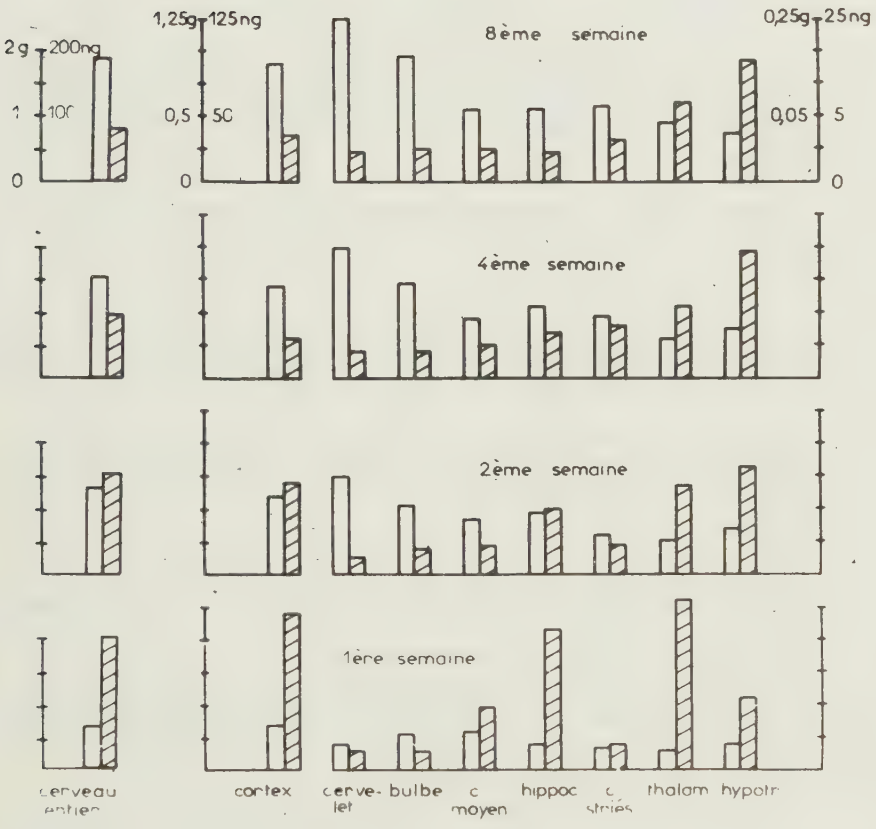
Corps striés et hypothalamus. Dans ces deux régions, on constate particulièrement dans l'hypothalamus, une augmentation de l'histamine. Ce phénomène est inverse de ce qui est enregistré pour les autres régions.

Le mode d'expression des résultats faisant intervenir la concentration en histamine, ne permet pas du fait de l'augmentation de poids des tissus, de mettre clairement en évidence ce comportement particulier de l'hypothalamus et des corps striés.

Figure 4

Répartition régionale de l'histamine cérébrale en fonction de l'âge

Colonnes blanches : poids en grammes
Colonnes hachurées : histamine en nanogrammes



Discussion

A partir d'une semaine, les variations régionales en concentration et en quantité totale d'histamine se modifient de façon différente dans chaque structure, mais avec une tendance toutefois à la stabilisation plus ou moins tardive selon les régions.

Cette variation biphasique des taux d'histamine permettrait de penser qu'elle joue deux rôles au moins quantitativement différents, au cours du développement cérébral.

Les phases de développement déjà décrites n'ont pas lieu au même moment pour toutes les régions cérébrales (46) (30) (100).

Une connaissance plus approfondie de la vascularisation, de l'hydratation, des concentrations ioniques, de la synthèse protéique, au niveau de chacune des régions, nous permettrait d'interpréter les variations de concentration d'histamine que nous avons observées.

Dans le cas du bulbe et du cerveau moyen, la vascularisation de la plupart des noyaux gris (46) coïncide avec la rapide stabilisation de la concentration en histamine.

Le cortex possède pratiquement sa vascularisation définitive à la fin de la phase III (27) (21) ; nous avons constaté qu'à la quatrième semaine la concentration d'histamine est déjà stabilisée.

Dans le cas du cervelet (30), bien que la vascularisation se fasse lentement, une grande partie de celle-ci est déjà formée à la deuxième semaine. A ce moment, la concentration d'histamine est déjà fortement diminuée.

L'hypothalamus est une région à développement précoce (35) (150) ceci pourrait expliquer la constance des concentrations en histamine.

Malheureusement, les informations sur le développement des différentes régions cérébrales sont très fragmentaires. Elles sont insuffisantes pour pouvoir établir des relations plus précises entre les variations des concentrations en histamine et les différents phénomènes qui ont lieu au niveau de chaque région.

Les variations régionales d'autres amines biogènes en fonction de l'âge sont très différentes de celles de l'histamine. Le taux de ces amines augmente progressivement à partir de la naissance (124) (125) (13).

CONCLUSIONS GENERALES

Dans le but d'étudier l'histamine dans le système nerveux central, nous avons mis en oeuvre un dosage fluorimétrique de l'histamine. Ce dosage est précédé d'une purification chromatographique de l'extrait tissulaire, à l'aide d'échangeurs d'ions (Amberlite CG50 et Cellex P), dont nous avons étudié la sélectivité.

Ce dosage est appliqué à la détermination dans le cerveau entier et les différentes régions cérébrales des taux normaux de cette amine chez différentes espèces.

L'histamine n'a de répartition homogène chez aucune des espèces étudiées. L'hypothalamus est dans tous les cas la région la plus riche en histamine.

Nos expériences se sont poursuivies chez le rat. Cette espèce a été choisie du fait de son insensibilité aux actions pharmacologiques périphériques de l'histamine.

A l'aide d'une technique d'ultracentrifugation, nous avons séparé deux formes d'histamine dans le tissu nerveux : l'histamine "libre" et l'histamine "liée".

Ces deux formes ont été déterminées dans le cerveau entier et dans les différentes régions cérébrales. La proportion de chacune de ces deux formes n'est pas homogène pour toutes les régions.

Nous avons envisagé pour les régions à plus forte proportion en histamine "liée" la possibilité d'un rôle spécifique de cette amine dans la transmission synaptique.

L'histamine a été dosée dans le cerveau entier et les différentes régions cérébrales de la naissance à l'âge adulte.

Des variations de taux d'histamine ont été trouvées en fonction de l'âge.

Les taux plus élevés pendant la première période de la vie post-natale, nous ont amenés à discuter les rapports de cette amine avec les phénomènes caractéristiques du développement du tissu nerveux.

Les régions cérébrales présentent chacune des variations de concentration en histamine en fonction de l'âge qui lui sont particulières. Ces variations ont été discutées en tenant compte des connaissances actuelles sur le développement de chaque région cérébrale.

Nous croyons que l'étude d'une méthode sélective et les déterminations de l'histamine cérébrale que nous avons effectuées constituent un point de départ pour des études plus approfondies sur le rôle de cette amine dans le système nerveux central.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ADAM H.M., HARDWICK D.C. et SPECER K.E.V. -

A method of estimating histamine in plasma.
Brit. J. Pharmac. Chemother., 1957, 12, 397-405.

2 - ADAM H.M. -

Histamine in the central nervous system and hypophysis of the dog.
Regional Neurochemistry, 1961, 293-306, Ed. Kety S.S. Elkes. Pergamon Press Oxford.

3 - ADAM H.M. et HYE H.K.A. -

Effect of drugs on the concentration of histamine in the hypophysis and proximate parts of the brain.
J. Physiol. (Lond.), 1964, 171, 37-38.

4 - ADAM H.M. et HYE H.K.A. -

Concentration of histamine in different parts of brain and hypophysis of cat and its modifications by drugs.
Brit. J. Pharmacol. Chemother. 1066, 28, 137-152.

5 - ALLAIN P. -

Quelques considérations sur la structure et l'activité de l'histamine.
Thérapie, 1969, 24, 757-765.

6 - ALTMAN J. et DAS G.D. -

Postnatal origin of microneurones in the rat brain.
Nature, 1965, 207, 953-956.

7 - ALTMAN J. -

Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. III Date the time of production and onset of differentiation of cerebellum microneurons in rats.
J. Comp. Neurol., 1969, 136, 269-294.

8 - ALTMAN J. -

Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.
J. Comp. Neurol., 1969, 137, 433-458.

9 - AMBROSE J.A., CRIMM A., BURION J., PAULLIN K. et ROSS O. -

Fluorometric determination of histidine.
Clin. Chem., 1969, 15, 361-366.

10 - ANDREWS A.C. et LYONS T.D. -

Quantitative determination of histamine in presence of certain interfering metallic ions.
Anal. Chem., 1957, 29, 1325-1327.

11 - ANTON A.H. et SAYRE D.F. -

A modified fluorometric procedure for tissue histamine and its distribution in various animals.
J. Pharm. Exp. Ther., 1969, 166, 285-293.

12 - AURES D., FLEMING R. et HAKANSON R. -

Separation and detection of biogenic amines by thin-layer chromatography. Microanalysis of tissue amines and of enzymes involved in their metabolism.
J. Chromatog., 1968, 33, 480-493.

13 - BAKER P.C. et QUAY W.B. -

5-hydroxytryptamine metabolism in early embriogenesis and the development of brain and retinal tissues.
Brain Research, 1969, 12, 273-295.

14 - BARAUD J.L., GENEVOIS L., MANDILLON G. et RINGENBACH G. -

Determination of histamine in blood during poisoning.
C.R. Acad. Sc. Paris, 1946, 222, 760-761.

15 - BARSOUM G.S. et GADDUM J.H. -

The pharmacological estimation of adenosine and histamine in blood.
J. Physiol. (London), 1935, 85, 1-14.

16 - BERGSTROM S. et HANSSON G. -

The use of amberlite IRC-50 for the purification of adrenaline and histamine.
Acta Physiol. Scand.,1951, 22, 87-92.

17 - BOGDANOVA E.V. et TOLKACHERO G.M. -

The level of free aminoacids in the brain tissue of rat at various ages.
J. Evol. Biol. Physiol., 1968, 4, 37-41.

18 - BONASERA N., SMORTO M. et BONAVITA V. -

Isoniazid seizures in the developing rat and the content of pyridoxal-5-phosphate in the brain.
Brain Research, 1967, 4, 383-386.

19 - BURKHALTER A. -

The formation of histamine by fetal rat liver.
Biochem. Pharmacol., 1962, 11, 315-322.

20 - CAIS M. -

The spectrofluorimetric assay of serotonin and histamin in tissues following a common extraction procedures.
Med. Exp., 1961, 5, 73-76.

21 - CALEY D.W. et MAXWELL D. -

Development of the blood vessels and extra-cellular space during postnatal maturation of the rat cerebral cortex.
J. Comp. Neurol., 1970, 138, 31-47.

22 - CARLINI E.A. et GREEN J.P. -

The measurement of histamine in brain and its distribution.
Biochem. Pharmacol., 1963, 12, 1448-1449.

23 - CARLINI E.A. et GREEN J.P. -

The subcellular distribution of histamine slow-reacting substance and 5HT in the brain of the rat.
Br. J. Pharmac. Chemother., 1963, 20, 264-277.

24 - CODE C.F. et Mc INTIRE F.C. -

Quantitative determination of histamine.
Methods of Biochem. Anal., 1956, III, 49-95.

25 - COLQUHOUN D. et TATTERSALL M.L. -

Rapid histamine assays : a method and some theoretical considerations.
Br. J. Pharmac., 1970, 38, 241-252.

26 - CRAGIE E.H. -

I. On the relative vascularity of various part of the central nervous system of the albino rat.
J. Comp. Neurol., 1920, 31, 429-464.

27 - CRAGIE E.H. -

The vascularity of the cerebral cortex of the albino rat.
J. Comp. Nuerol., 1921, 33, 193-212.

28 - CRAGIE E.H. -

Changes in the vascularity in the brain stem and cerebellum of the albino rat of between birth and maturity.
J. Comp. Neurol., 1924, 38, 27-48.

29 - CRAGIE E.H. -

Measurement of vascularity in some hypothalamic nuclei of the albino rat.
Proc. Ass. Res. Nerv. Ment., 1940, 20, 310-319.

30 - CRAGIE E.H. -

Vascular patterns of the developing nervous system, In : Biochemistry of the developing nervous system, 1955, pp 28-51.
Ed. Waelsch, H. Acad. Press New York.

31 - CROSSLAND J.

Chemical transmission in the central nervous system.
J. Pharm. Pharmacol., 1960, 12, 1-36.

32 - CROSSLAND J. -

Biological estimation of histamine.
Methods in Medical Research, 1961, 9, 186-191.

33 - CROSSLAND J., WOODRUFF G.N. et WOODRUGG J.H. -

The histamine content of brain during bulbocapnine induced catalepsy.
Life Sci., 1966, 5, 193-197.

34 - DALE H.M. et DUDLEY H.W. -

The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse.
J. Physiol., (London), 1929, 68, 97-123.

35 - DANILOVA O.A. -

Development of the hypothalamo-hypophysial system during ontogenesis of rats, and histochemistry of neurosecretory substance.
Neurosekretornye Elementy i ikh znachenie v organizme (Leningrad), 1964, 153-157.

36 - DE ROBERTIS E., RODRIGEZ DE LORES ARNAIZ G., SALGANICOFF L., PELLEGRINO DE IRALDI A. et ZIEHER L.M. -

Isolation of synaptic vesicles and structural organization of the acetylcholine system within brain nerve endings.
J. Neurochem. 1963, 10, 225-235.

37 - DE ROBERTIS E. -

Electron microscope and chemical study of binding sites of brain biogenic amines.
Prog. Brain Res., 1964, 8, 118-136.

38 - DE ROBERTIS E., PELLEGRINO DE IRALDI A., RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ G. et ZIEHER L.M. -

Synaptic vesicles from the rat hypothalamus isolation and norepinephrine content.
Life Sci., 1965, 14, 193-201.

39 - DIETZEL M., MASSION W.H. et HINSHAW L.B. -

The mechanism of histamine induced transcapillary fluid movement.
Prlügers. Arch. Europ. J. Physiol., 1969, 309, 99-106.

40 - DIXON J.B. -

Histamine, 5-hydroxytryptamine and serum globulines in the foetal and neonatal rat liver.
J. Physiol., (London), 1959, 147, 144-157.

41 - DODGE A.C. -

A test for pregnancy based on the histaminolytic activity of serum.
Amer. J. Obstet. Gynec., 1952, 63, 1213-1222.

42 - DONIER F.R. -

Effects of histamine on potassium exchange between the blood and cerebrospinal fluid.
Exp. Neurol., 1969, 24, 65-75.

43 - EARYS J.T. et GOODHEAD B. -

Postnatal development of the cerebral cortex in the rat.
J. Anat., 1959, 93, 385-402.

44 - ELLIOT B. et MICHAELSON I.A. -

A improved method for the fluorimetroc estimation of spermidine.
Anal. Biochem., 1967, 19; 184-187.

45 - ERSPAMER V. -

Pharmacologically active substances of mammalian origin.
Ann. Rev. Pharmac., 1961, 1, 175-218.

46 - FRIEDE R.L. -

Topographic brain chemistry, 1966, pp. 1-15, Acad. Press New York.

47 - FRIEDE R.L. -

Topographic brain chemistry, 1966, pp. 359-360, Acad. Press New York.

48 - FUYUO O. -

Formation of amine in fish muscle. IV Rapid method for the determination of histamine in fish muscle.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries, 1958, 24, 27.

49 - GAITONDE M.K. et MARTENSON R.E. -

Metabolism of highly basic proteins of rat brain during postnatal development.
J. Neurochem., 1970, 17, 551-563.

50 - GADDUM J.H. -

The thecnique of superfusion.
Br. J. Pharmac. Chemother., 1953, 8, 321-326.

51 - GLOWINSKI L. et IVERSEN L.L. -

Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. The disposition of (^{3}H) norepinefrine, (^{3}H) dopamine and (^{3}H) DOPA in various region of the rat brain.
J. Neurochem., 1966, 13, 665-669.

52 - GRAHAM H.T., HANNEGAN T.W. et NOURSE C.M. -

Dependence of tissue histamine content on histidine decarboxylase activity.
Biochem. Biophys. Acta, 1956, 20, 243-250.

53 - GRAHAM H.T., SCARPELLINI J.A.D., HUBKA B.P. et LOWRY O.H. -

Measurement and normal range of free histamine in human blood plasma.
Biochem. Pharmacol., 1968, 17, 2271-2280.

54 - GREEN H., et ERICKSON R.W. -

Effect of some drugs upon rat brain histamine content.
Int. J. Neuropharmac., 1964, 3, 315-320.

55 - GREEN H. et ERICKSON R.W. -

Effects of some drugs upon the histamine concentration of guinea pig brain.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 1967, 166, 121-126.

56 - GREEN J.P. -

Histamine and the nervous system.
Fed. Proc., 1964, 23, 1095-1102.

57 - GROMAKOVSKAYA M.M. -

Role of histamine in changing the permeability of the blood brain barrier, and functional state of autonomic center during muscle fatigue.
Razv. Regul. Gisto-geunaticheskikh Barlevov, 1967, 76-85.

58 - GRUNDEMEIER E.W. -

Spectrophotometric determination of histidine and histamine in their mixtures.
Trans. Kansas Acad. Sci., 1965, 68, 62-64.

59 - GUTMAN J. -

The intracellular distribution of brain catecholamines.
J. Neurochem., 1967, 14, 619-625.

60 - HAKANSON R. -

Histidin decarboxylase in experimental tumours.
J. Pharm. Pharmacol., 1966, 18, 769-774.

61 - HAKANSON R. -

Histamine forming isoenzymes in the fetal and adult mouse.
Europ. J. Pharmacol., 1967, 1, 34-41.

62 - HANKE M.T. et KOESSLER K.K. -

Studies on proteogenous amines. VIII a method for quantitative colorimetric estimation of histamine in protein and protein cont ning matter.
J. Biol. Chem., 1920, 43, 543-556.

63 - HIMWICH W.M. -

Biochemical and neurophysiological development of the brain in the neonatal period.
Int. Rev. Neurobiol., 1962, 4, 117-158.

64 - HOLMES F. et JONES F. -

Metal complexes of histamine and some structural analogs.
J. Chem. Soc., 1960, 2398-2401.

65 - HOLTZ P. et WESTERMANN E. -

Uber die dopadecarboxylase und histidinedecarboxylase des nervengewebes.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmak., 1956, 227, 538-546.

66 - HUGHES D.E., SALVIN E. et WOOD D.R. -

Decarboxylation of histidine as a source of error in extracting histamine from tissues.
J. Physiol. (London), 1951, 113, 218.

67 - ISHIMARA J. -

Role of histamine in inflamation. I- Estimation of histamine with 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB).
Nippon Saikingaku Zasshi, 1957, 12, 183-188.

68 - JOHNSON H.M. -

Microchemical method for the determination of histamine.
Arch. Dermatol., 1955, 72, 307-312.

69 - JONES R.G. -

Chemistry of histamine and analogs. Relationship batween structure and pharmacological activity.
In Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. XVIII/1, 1966, pp. 1-43, Ed. O. Eichler, Farah, A. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

70 - KAHLSON G., ROSENGREN E. et WESTLING H. -

Increase formation of histamine in the pregnant rat.
J. Physiol. (London), 1958, 143, 91-103.

71 - HAHLSON G., ROSENGREN E., WESTLING H. et WHITE T. -

The site of increased formation of histamine in the pregnant rat.
J. Physiol., 1958, 144, 337-348.

72 - KAHLSON G. et NILSSON K. -

Prevention of foetal development by enzyme inhibition.
Nature, 1959, 184, 1238-1239.

73 - KAHLSON G., ROSENGREN E. et WHITE T. -

Formation of histamine by the foetus in the rat and man.
J. Physiol., (London), 1959, 145, 30-31.

74 - KAHLSON G., ROSENGREN E. et WHITE T. -

The formation of histamine in rat foetus.
J. Physiol. (London), 1960, 151, 131-138.

75 - KAHLSON G., NILSSON K., ROSENGREN E. et ZEDERFELDT B. -

Wound healing as dependant on rate of histamine formation.
Lancet II, 1960, 279, 230-234.

76 - KAHLSON G. et ROSENGREN E. -

Histamine.
Ann. Rev. Pharmac., 1965, 5, 305-321.

77 - KANTOR N., LEVINE J. et FISCHBACH H. -

Chemical determination of histamine in streptomycin and dihydrostreptomycin.
Antibiot. Chemiother., 1951, 1, 579-585.

78 - KARKI N.T., KUNTMAN R. et BRODIE B.B. -

Storage, synthesis and metabolism of monoamines in the developing brain.
J. Neurochem., 1962, 9, 53-58.

79 - KATAOKA M. et DE ROBERTIS E. -

Histamine in isolated small nerve endings and synaptic vesicles of rat brain cortex.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1967, 156, 114-125.

80 - KATOR R. -

Serotonin content of rat brain in relation to sex and age.
J. Neurochem., 1960, 5, 202.

81 - KELSALL M.A. et LEWIS P. -

Mast cell in the brain.
Fed. Proc., 1964, 23, 1107-1108.

82 - KESTON A.S., UDENFRIEND S. et CANNOR R.K. -

Micro-analysis of mixtures (amino-acids) in the form of isotopic derivatives.
J. Amer. Soc., 1946, 68, 1390.

83 - KESZTYUS L. -

Uber die azoverbindungen des histamins.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak., 1948, 205, 287-290.

84 - KOESSLER K.K. et HANKE M.T. -

Studies on proteogeneous amines. II A microchemical colorimetric method for estimating imidazole derivatives.
J. Biol. Chem., 1919, 39, 497-519.

85 - KOESSLER K.K. et HANKE M.T. -

Studies on proteogenous amines. III A quantitative method for separating histamine from histidine.
J. Biol. Chem., 1919, 39, 521-537.

86 - KONZETT M. et ROSSLER R. -

Vesuchsanordnung zu untersuchungen an der bronquial-muskulatur. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak., 1940, 195, 71-74.

87 - KREMZNER L.T. et WILSON I.B. -

A procedure for the determination of histamine. Biochem. Biophys. Acta, 1961, 50, 364-367.

88 - KREMZNER L.T. -

Determination of brain histamine by fluorometric assay. Fedn. Proc., 1965, 24, 578.

89 - KREMZNER L.T. -

A micro fluorometric method for determining spermidine. Anal. Biochem., 1966, 15, 270-277.

90 - KREMZNER L.T. et PFEIFFER C.G. -

Identification of substances interfering with the fluorometric determination of brain histamine. Biochem. Pharmacol., 1966, 15, 197-200.

91 - KURAHASHI K. et FUJIWARA M. -

Fluorometric assay of tissue histamine. Jap. J. Pharmacol., 1969, 19, 250-248.

92 - KWIATKOWSKY J. -

Histamine in nervous tissue. J. Physiol. (London), 1943, 102, 32-41.

93 - LECOMTE J. -

Effets cardio-vasculaires de l'administration continue de 5-hydroxytryptamine et d'histamine au rat normal. Arch. Int. Pharmacodyn., 1969, 177, 290-297.

94 - LEVINE R.J., SATO T.L. et SJOERDSMA A. -

Inhibition of histamine synthesis in the rat by -hidrazino analog of histidine and 4-bromo-3-hydroxybenzyloxyamine. Biochem. Pharmacol., 1965, 14, 139-149.

95 - LORENZ W., HABACH S.T., GERANT M. et WERLE E. -

Specific histidine decarboxylases in the gastric mucosa of man and other mammals. Determination, location and properties. Biochem. Pharmacol., 1969, 18, 2625-2637.

96 - LOWRY O.H., GRAHAM H.T., HARRIS F.B., PRIEBAT M.K., MARKS A.R. et BREGMAN R.U. -

The chemical measurement of histamine in blood plasma and cells. J. Pharmacol., Exp. Ther., 1954, 112, 116-126.

97 - LUBSCHEZ R.J. -

Chemical determination of histamine in human blood. J. Biol. Chem., 1950, 183, 731-738.

98 - Mc GEER P.L. -

The distribution of histamine in cat and human brain. Comparative Neurochemistry, 1964, pp. 387-391, Ed. Derek R. Pergamon Press, Oxford.

99 - MACKAY D., REID J.D. et SHEPHERD D.M. -

Histidine decarboxylase and growth. Nature, 1961, 191, 1311-1312.

100 - Mc ILWAIN H. -

Biochemistry and the central nervous system, 1966, pp. 290-299. Third Ed. J. and A. Churchill L.T.D. London.

101 - Mc INTIRE F.C., ROTH L.W. et SHAW J.L. -

Purification of histamine for bioassay. J. Biol. Chem., 1947, 170, 537-544.

102 - Mc INTIRE F.C., WHITE F.B. et SPROULL M. -

The determination of histamine with 2,4 dinitrofluorobenzene. Arch. Biochem., 1950, 29, 376-386.

103 - Mc INTIRE F.C. -

The determination of histamine in pharmaceutical products by means 2, 4-dinitrofluorobenzene. J. Amer. Pharm. Ass. Sci., Ed. 1952, 41, 277.

104 - MAJNO G., SHEA S.M. et LEVENTHAL M. -

Endothelial contraction induced by histamine type mediators. An electron microscopic study.
J. Cell. Biol., 1969, 42, 647-672.

105 - MASLINSKI C. et NIEDZIELSKI A. -

Histidine decarboxylase in mouse foetal tissues. II Physiological role of the enzyme in delivery.
Europ. J. Pharmacol., 1969, 5, 196-202.

106 - MAYNERT E.W., LEV R. et DE LORENZO A.J.D. -

The presence of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine in vesicles from disrupted nerve endings particles.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1964, 114, 385-392.

107 - MEDINA M. et SHORE P.A. -

Increased sensitivity in a specific fluorometric method for brain histamine.
Biochem. Pharmacol., 1966, 15, 1627-1629.

108 - MICHAELSON I.A. et WHITTAKER V.P. -

The subcellular distribution of histamine in guinea pig brain.
Biochem. J., 1962, 84, 31-32 p.

109 - MICHAELSON I.A. et DOWE G. -

The subcellular distribution of histamine in brain tissue.
Biochem. Pharmacol., 1963, 12, 949-956.

110 - MICHAELSON I.A. -

Purification of brain histamine for fluorometric assay.
Fed. Proc., 1966, 25, 691.

111 - MICHAELSON I.A. -

Spermidine : A contaminant in the n-butanol extraction of brain in the fluorometric assay of histamine.
Europ. J. Pharmacol., 1967, 1, 378-382.

112 - MICHAELSON I.A. et COFFMAN P.Z. -

The subcellular localization of histamine in guinea pig brain. A re-evaluation. Biochem. Pharmacol., 1967, 16, 2085-2090.

113 - MICHAELSON I.A., COFFMAN P.Z. et VEDRAL D.F. -

The regional distribution of histamine in brain of the rhesus monkey (Macaca mulatta).
Biochem. Pharmacol., 1968, 17, 2435-2441.

114 - MICHAELSON I.A. et COFFMAN P.Z. -

An improved ion-exchange purification procedure for the fluorometric assay of histamine.
Anal. Biochem., 1969, 27, 257-261.

115 - MICHAELSON I.A. et SMITHSON H.R. -

Halogen quenching of spermidine for the fluorometric estimation of histamine.
Fed. Proc., 1970, 29, 617, abs. 2082.

116 - MONNIER M., FALLERT M. et BHATTACHRYA I.C. -

The waking action of histamine.
Experientia, 1967, 23, 21-22.

117- NORTHOVER A.M. et NORTHOVER B.J. -

The effects of histamine, 5-hydroxytryptamine and bradikinin on rat mesenteric blood vessels.
J. Pathol., 1969, 98, 265-276.

118 - ONO S., et HAGEN P. -

Pyridoxal phosphate : a coenzyme for histidine decarboxylase.
Nature, 1954, 184, 1143-1144.

119 - PAULY H. -

Uber die konstitution des histidins. I. Mitteilung.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1904, 42, 508-518.

120 - PEARCE L.A. et SCHANBERG S.M. -

Histamine and spermidine content in brain during development.
Science, 1969, 166, 1301-1304.

121 - PEESEZ M. et POIRIER P. -

Sur la recherche et le dosage des amines aliphatiques primaires par réaction colorée.
Bull. Soc. Chim. Fr., 1953, 20, 754-756.

22 - PERRY T.L., HANSENS S. et Mac DOUGALL L. -

Amines oh human whole brain.
J. Neurochem., 1967, 14, 775-782.

23 - PRAVDICH-NEMINSKAIA T.V. -

On the possible role of imidazol compounds in nerve activity processes (exemplified by histamine).
Dok. Akad. Nauk. S.S.S.R., 1969, 186, 1452.

24 - PSCHEIDT G.R., SCHWEIGERDT A. et HIMWICH H.E. -

Effects of some psychoactive drugs on electroencephalogram and brain amines of immature rabbits.
Life Sci., 1965, 4, 1333-1343.

25 - PSCHEIDT G.R. et HIMWICH H.E. -

Biogenic amines in various brain regions of growing cats.
Brain Research, 1966, 1, 363-368.

26 - PUJOL J.F. -

Monoamines et sommeil.
Thèse médecine, Lyon, 1969.

27 - REILLY M.A. et SCHAYER R.W. -

Histamine (H) formation and catabolism in mouse brain.
Fed. Proc., 1970, 29, 617 Abs. (2083).

28 - ROCHA e SILVA M. -

Action of histamine upon the circulatory apparatus.
in : Histamine and anti-histaminics. Handbook Experimental Pharmacology, Vol. XVIII, Part 1, 1966, pp. 238-279, Ed. Pichler, O.,Farah A. Springer Verlag.

29 - RONNBERG A. et SCHWARTZ J. C. -

Répartition régionale de l'histamine dans le cerveau de rat.
C.R. Acad. Sci., Paris, 1969, 268, Série D., 2376-2379.

30 - ROSENTHAL S.M. et TABOR H. -

An improved colorimetric method for the estimation of histamine.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1948, 92, 425-431.

131 - RUFF F., SAINDELLE A., DUTRIPON E. et PARROT J.L. -

Continous automatic fluorometric evaluation of total blood histamine.
Nature, 1967, 214, 279-281.

132 - RUNG F. et BEHREND M. -

Notizen über glyoxalin.
Annalen, 1892, 271, 28-40.

133 - SAGER O.S. et HOROWITZ W. -

A chemical method for the determination of histamine in canned tuna fish.
J. Ass. Offic. Agr. Chem., 1957, 40, 892-904.

134 - SANGER F. -

The free amino groups of insulin.
Biochem. J., 1945, 39, 507-515.

135 - SCHALIEN S.N.R. -

Potentiometric studies on histamine and its metal chelates.
I. Ionization constants of histamine in aqueous potassium chloride solutions.
Suomen Kemistilchti, 1958, 31 B, 372-374.

136 - SCHANBERG S.M. et GIARMAN N.J. -

Drug induced alterations in the subcellular distribution of 5-hydroxytryptamine in rat's brain.
Biochem. Pharmacol., 1963, 11, 187-194.

137 - SCHAYER R.W., KOBAYASHI Y. et SMILEY R.L. -

Determination of histamine as an isotopic derivative.
J. Biol. Chem., 1955, 212, 593-598.

138 - SCHAYER R.W. -

The metabolism of histamine in various species.
Br. J. Pharmac. Chemother., 1956, 11, 472-473.

139 - SCHAYER R.W. -

Further evidence that pyridoxal phosphate is the coenzyme of mammalian histidine decarboxylase.
Fed. Proc., 1959, 18, 317 abs. (1256).

140 - SCHAYER R.W. -

Significance of induced synthesis of histamine in physiology and pathology.
Chimiotherapy, 1961, 3, 128-136.

141 - SCHAYER R.W. -

Evidence that induced histamine is an intrinsic regulator of the microcirculatory system.
Amer. J. Physiol., 1962, 202, 66-72.

142 - SCHAYER R.W. -

Histamine and a possible unity of autonomous microcirculatory dilator responses. Histamine and Autonomous dilatation.
MCV Quarterly, 1968, 4, 101-106.

143 - SCHINDLER R.M., DAY M. et FISCHER G.D. -

Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxy-tryptamine and histamine in vitro.
Cancer Res., 1959, 19, 47-51.

144 - SCHMIDT F. et VORHEISOR D. -

Uber die isolierung und bestimmung des histamine mit hilpe der papier chromatographie.
Natur-Wissenschaften, 1955, 42, 392.

145 - SCHMIDT F. et GRUHN I. -

Tine methods zur erfassung kleinster histamin-mengen.
Natur-wissenschaften, 1955, 42, 391-392.

146 - SCHMITERLOW C.G. -

Some remarks on determination of histamine with special reference to horse blood.
Acta. Physiol. Scand., 1949, 19, 260-269.

147 - SHORE P.A., BURKHALTER A. et COHN V.H. -

A method for the fluorometric assay of histamine in tissues.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1959, 127, 182-186.

148 - SIDMAN R.L., DICKIE M.M. et APPEL S.M. -

Mutant mice (quaking and jimpy) with deficient myelination in the central nervous system.
Science, 1964, 144, 309-311.

149 - SIDMAN R.L., GREEN M.C. et APPEL S.M. -

Catalog of the neurological mutans of the mouse.
Harvard University Press, 1965.

150 - SMIECHOWSKA B. -

Histochemical studies on the hypothalamus differentiation in the white rat during ontogenesis.
Folia Morph. (Warszawa), 1964, 15, 227-256.

151 - SMITH J.K. -

The purification and properties of placental histaminase.
Biochem. J., 1967, 103, 110-119.

152 - STEFANOVIC U., CIRKOVIC D. et BRESSANEC M. -

New color reaction for the identification and determination of histamine.
Acta Pharma. Yugosl., 1959, 9, 153-155.

153 - STEPANYAN E.P. -

Paper chromatographic method of estimating the amount of free histamine in the blood of normal and hypertensive persons.
Klin. Med. (URSS), 1954, 32, 42-46.

154 - SNYDER S.H., GLOWINSKY J. et AXELROD J. -

The physiologic disposition of ^{3}H histamine in the rat brain.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1966, 153, 8-14.

155 - SNYDER S.H., BALDESSARINI R.S. et AXELROD J. -

A sensitive and specific enzymatic isotopic assay for tissue histamine.
J. Pharmacol. Exp. Pher., 1966, 153, 544-549.

156 - SPERRY W.R. -

Lipides of the brain during early development in the rat.
In Biochemistry of the developing nervous system., 1955, pp. 261-267. Ed. Waelsch, H. Acad. Press New York.

157 - TELFORD J.M. et WEST G.B. -

The effect of age on the formation of histamine in the rat.
J. Physiol. (London), 1961, 157, 306-314.

158 - THOUVENOT J., FLAVIAN N. et WEBER R. -

Sur une méthode colorimétrique du dosage de l'histamine, mise au point.
Bul. Soc. Chim. Biol. (Paris), 1957, 39, 1511-1519.

159 - URBACH K.F. et GISCAFRE L. -

Identification of histamine in blood by paper chromatography.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1948, 68, 430-431.

160 - VLADIMIROV G.E. -

Blood brain barrier as a factor hindering the investigation of incorporation of 32p into adenosine triphosphate and phosphocreatine.
In:Biochemistry of the developing nervous system, 1955, pp. 218-222, Ed. M. Waelsch, Academic Press N.Y.

161 - VON REDLICH D. et GLICK D. -

Improvements in fluorometric microdeterminations of histamine and serotonin .
Anal. Biochem., 1969, 29, 167-171.

161 bis - VUGMAN I. et ROCHA E SILVA E. -

Biological determination of histamine in living tissues and body fluids.
In : Handbook of experimental Pharmacology. Vol. XVIII/1. 1966, pp. 81-115. Ed. Eichler O. et Farah A., Springer Verlag.

162 - WAELSCH H. -

The turnover of compounds of the developing brain. The blood-brain barrier.
In : Biochemistry of the developing nervous system, 1955, 187-201. Ed. Waelsch. Acad. Press, New York.

163 - WEISS M. et Ssolobew N. -

Uber ein coloor metrisches verfahren zur quantitativen bestimmung des histidins.
Biochem. Z., 1914, 58, 119-129.

164 - WEISSBACH H., LOVENBERG W. et UNDEFRIEND S. -

Characteristics of mammalian histidine-decarboxylating enzymes.
Biochim. Biophys. Acta, 1961, 50, 177-179.

165 - WEISSBACH H., WAALKES T. et UNDENFRIEND S. -

A simplified method for measuring serotonin in tissues ; simultaneous assay of both serotonin and histamin.
J. Biol. Chem., 1968, 230, 865-871.

166 - WHITE T. -

Formation of histamin by brain tissue of the cat in vitro.
J. Physiol. (London), 1957, 143, 62.

167 - WHITE T. -

Formation and catabolism of histamin in brain tissue in vitro.
J. Physiol., (London), 1959, 149, 34-42.

168 - WHITE T. -

Formation and catabolism of histamine in cat brain in vivo.
J. Physiol. (London), 1960, 152, 299-308.

169 - WHITE T. -

Biosynthesis, metabolism and function of histamine in the nervous tissue.
Fed. Proc., 1964, 23, 1103-1106.

170 - WHITE T. -

Histamine and methylhistamine in cat brain and other tissues.
Br. J. Pharmac. Chemother., 1966, 26, 494-501.

171 - YUSEM M. -

Chemical estimation of histamine in gastrin.
Fed. Proc., 1961, 20 250.

172 - YUSEM M., DELANEY W.E., LINDBERG M.A. et FASHING E.M. -

An improved fluorimetric determination of histamine by stabilizing the o-phtalaldehyde reagent.
Anal. Chim. Acta., 1969, 44, 403-409.

173 - ZIEHER L.M. et De ROBERTIS E. -

Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine in rat brain.
Biochem. Pharmacol., 1963, 12, 596-598.

174 - ZUBKOVA S.R., RAPOPORT S. Ya., et SHCHORS N.V. -

Relation between the hematoencephalic barrier permeability for serotonin in the ontogenesis of rats and its formation in the same age periods in the brain.
Razv. Regul. Gisto-Genaticheskikh. Barlerov., 1969, 174-181.

--

COPEDITH, 70 rue de Flandre - PARIS XIXe